

BETA-ADRENERGE REZEPTOREN
INTAKTER MENSCHLICHER
LYMPHOCYTEN

Nachweis, Quantifizierung
und klinische Bedeutung

Christina Unterberg

Diss
München
1985

Aus der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern

Direktor: Professor Dr. med. G. Riecker

BETA-ADRENERGE REZEPTOREN INTAKTER MENSCHLICHER LYMPHOCYTEN

- Nachweis, Quantifizierung und klinische Bedeutung -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christina Unterberg
aus Schwelm

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. W. Krawietz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Riecker

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.3.1985

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. <u>EINLEITUNG</u>	1
1. Erläuterung des Rezeptorbegriffes	1
2. Die Unterscheidung adrenerger Rezeptoren	2
3. Biochemische Charakterisierung adrenerger Rezeptoren	8
4. Biologische und pharmakologische Beeinflussbarkeit des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems	12
5. Untersuchungen des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems an menschlichen Organen und Zellen	15
6. Ziel dieser Arbeit	22
B. <u>MATERIAL UND METHODIK</u>	23
1. Material	23
2. Isolierungsmethode der mononukleären Zellen aus menschlichem Blut	24
3. Untersuchungen der Zellsuspension	28
3.1. Zählung der Zellen	28
3.2. Morphologische Differenzierung der Zellen	28
3.3. Testung der Vitalität der Zellen	29
4. Radioaktive Markierung von (+)-Cyanopindolol mit Na ¹²⁵ Jodid	29
5. Bindungsversuche mit dem radioaktiv markierten beta-adrenergen Antagonisten (+)- ¹²⁵ J-Cyanopindolol	30
5.1. Messung der Assoziationsreaktion	31
5.2. Messung der Dissoziationsreaktion	31
5.3. Messung der konzentrationsabhängigen Bindung	32
5.4. Messung der unspezifischen Bindung	33
5.5. Abtrennung des Zell-gebundenen vom freien Liganden	33
6. Statistische Auswertung	34

C. <u>ERGEBNISSE UND DEREN BESPRECHUNG</u>	35
I. <u>Charakterisierung einer beta-adrenergen Bindungsstelle an intakten menschlichen mononukleären Zellen</u>	35
1. Isolierung der mononukleären Zellen aus menschlichem Blut	35
2. Charakterisierung der spezifischen Bindung von (+)- ¹²⁵ I-Cyanopindolol an Betarezeptoren menschlicher mononukleärer Zellen	40
2.1. Theoretische Grundlagen zur Quantifizierung spezifischer Rezeptoren mittels radioaktiv markierter Liganden	40
2.2. Untersuchung zur Unterscheidung zwischen unspezifischer und spezifischer Bindung	44
2.2.1. Reversibilität, Kinetik und Affinität der Ligandenbindung	45
2.2.2. Stereoselektivität der spezifischen Ligandenbindung	53
2.2.3. Pharmakologische Spezifität der spezifischen Bindung	58
2.2.4. Sättigbarkeit der spezifischen Bindung	60
3. Quantifizierung der beta-adrenergen Rezeptoren menschlicher mononukleärer Zellen	60
3.1. Bestimmung der Rezeptorenzahl einer mononukleären Zelle durch konzentrationsabhängige Bindungshemmung im Äquilibrium	60
3.2. Einfluß anderer im mononukleären Zellkonzentrat enthaltener Blutzellen auf die Quantifizierung der Rezeptoren	66
3.2.1. Erythrocyten	66
3.2.2. Granulocyten	67
3.2.3. Monocyten	67
3.2.4. Thrombocyten	71
3.3. Untersuchung der methodischen und intra-individuellen Variabilität	75

II. <u>Klinische Bedeutung der Bestimmung beta-adrenerger Rezeptoren an intakten menschlichen mononukleären Zellen</u>	80
1. Betarezeptorendichte in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht	80
2. Betarezeptorendichte mononukleärer Zellen hyperthyreoter Personen	84
D. <u>DISKUSSION</u>	88
I. <u>Diskussion methodischer Probleme</u>	88
1. Anwendung verschiedener Trennungsmethoden der Blutzellbestandteile	88
2. Definition unspezifischer Bindung von radioaktiv markierten Liganden	91
3. Besonderheiten des radioaktiv markierten Liganden (+)- ¹²⁵ I-J-Cyanopindolol	95
II. <u>Klinische Anwendbarkeit von Betarezeptorenzahlbestimmung intakter menschlicher Lymphocyten</u>	99
1. Die Betarezeptorendichte intakter menschlicher Lymphocyten	99
2. Einfluß des Alters auf die Zahl der Betarezeptoren	106
3. Einfluß einer hyperthyreoten Stoffwechsellaage auf die Zahl der Betarezeptoren intakter menschlicher Lymphocyten	110
4. Bedeutung der Untersuchung des Betarezeptors von Lymphocyten	114
E. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	118
F. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	122

A. EINLEITUNG

1. Erläuterung des Rezeptorbegriffes

Die spezifische Wirkung von Hormonen und Pharmaka auf bestimmte Gewebe zeichnet sich durch folgende drei Schritte aus:

- (1) Es genügen schon äußerst geringe Konzentrationen des Hormons bzw. Pharmakons, die eine spezifische Struktur aufweisen müssen, um
- (2) mit einem zellulären Molekül eine Bindung einzugehen, die
- (3) dann zu einem biologischen Effekt führt.

Diese zellulären Moleküle bezeichneten Langley (96) und Ehrlich (52) als Rezeptoren. Die Bindung zwischen Hormon bzw. Pharmakon und Rezeptor löst z.B. Konformationsänderungen oder chemische Reaktionen aus, die letztlich einen biologischen Effekt hervorrufen. Eine solche spezifische Struktur einer Zelle, meist ein Makromolekül, wird demnach erst dadurch zum Rezeptor, daß durch selektive und hochaffine Bindung von Hormonen oder Pharmaka eine biologische Wirkung ausgelöst wird. Rezeptoren können sowohl membrangebunden als auch intrazellulär lokalisiert sein. So befinden sich z.B. die Rezeptoren für Steroide und Schilddrüsenhormone im Cytoplasma. Für folgende Hormone wurden membrangebundene Rezeptoren dargestellt: Insulin (45), Histamin (137), TSH (121), STH (102), Glucagon (17) und Katecholamine (98, 124). Derartige membrangebundene Rezeptoren wurden auch für Pharmaka bzw. Toxine nachgewiesen, so z.B. für Herzglykoside (55), Benzodiazepine (37) und Sympathikomimetika (73).

Die genauen biochemischen Reaktionsfolgen, die zur Auslösung einer biologischen Antwort führen, sind für die meisten Pharmaka noch unbekannt. Man konnte aber nachweisen, daß die bisher identifizierten Rezeptoren Proteinmoleküle sind, die in irgendeiner Weise an ein Enzymsystem gekoppelt sind, das als sogenannter "second messenger" die

spezifische Information vom Äußeren der Zelle ins Innere überträgt. Für den beta-adrenergen Rezeptor konnte man die Adenylatzyklase als Kopplungsenzym identifizieren. Die Bindung eines Betasympathikomimetikums führt zu einer Stimulation der Adenylatzyklase, konsekutiv wird intrazellulär cAMP (zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat) gebildet, das als "second messenger" Proteinkinasen aktiviert, die z.B. eine metabolische Reaktionskette wie Lipolyse oder Glykogenolyse auslösen.

2. Die Unterscheidung adrenerger Rezeptoren

Der Wirkungsmechanismus der Sympathikomimetika und des adrenergen Systems ist besonders in den letzten Jahren eingehend untersucht worden. Die wichtigsten physiologischen Katecholamine sind Noradrenalin, das überwiegend als Neurotransmitter in den postganglionären Synapsen des sympathischen Nervensystems freigesetzt wird, und Adrenalin, das als im Blut zirkulierendes Hormon hauptsächlich im Nebennierenmark gebildet wird. Die Katecholamine üben ihre Wirkung durch Bindung an spezifische Strukturen der Zielorgane, den adrenergen Rezeptoren aus.

Schon 1905 vermutete Dale (47), daß es mehrere Typen adrenerger Rezeptoren geben müsse, da die durch Adrenalingabe oder durch Reizung des sympathischen Nervensystems hervorgerufenen Effekte nur teilweise durch Mutterkornalkaloide antagonisierbar waren. Ahlquist (4) stellte bei der Messung physiologischer Effekte von natürlichen und synthetischen Katecholaminen und der Auflistung ihrer Wirkstärken fest, daß zwei Typen adrenerger Rezeptoren existieren, die er Alpha- und Beta- Rezeptoren nannte. Von den untersuchten Pharmaka führte Adrenalin an Gefäßen, Uterus, Ureter und M.dilatator pupillae zur stärksten Kontraktion, die er einer Erregung von Alpharezeptoren zuschrieb. Für die anderen sympathomimetischen Amine ergab sich an diesen Organen folgende charak-

teristische Reihenfolge der Wirkstärke:

Adrenalin > Noradrenalin > alpha-Methylnoradrenalin > alpha-Methyladrenalin > Isoproterenol.

Die Stimulation der sogenannten Betarezeptoren führte nach Zugabe von Isoproterenol zur größten Wirkung und wies folgende ihr eigene Reihenfolge der untersuchten Pharmaka auf: Isoproterenol > Adrenalin > alpha-Methyladrenalin > alpha-Methylnoradrenalin > Noradrenalin.

Die biologische Antwort besteht in einer Vasodilatation, einer Relaxation der Uterusmuskulatur und einer positiv inotropen und chronotropen Wirkung auf das Herz. Ahlquist (4) konnte weiterhin zeigen, daß in einem einzigen Organ wie z.B. dem Uterus beide adrenergen Rezeptoren lokalisiert sein können. Prinzipiell ist jedes Katecholamin sowohl zu einer alpha- als auch zu einer beta-adrenergen Stimulation fähig; hinsichtlich der Affinität zum Rezeptor und der Wirkstärke bestehen allerdings Unterschiede. Um die spezifische alpha- oder beta-adrenerge Wirkung zu untersuchen, bediente man sich möglichst selektiv wirkender Pharmaka, wobei sich Phenylephrin mit höherer Affinität zum Alpha- und nur geringer Affinität zum Beta- Rezeptor und Isoprenalin mit entgegengesetzter Affinität und Wirkstärke als geeignet erwiesen. Durch die Entwicklung von Alpha- (z.B. Phentolamin, Phenoxybenzamin) und Beta- (z.B. Dihydroalprenolol) Antagonisten konnte das Konzept adrenerger Rezeptoren weiter bestätigt werden, wobei grundsätzlich die schon 1910 von Dale (14, 47) aufgezählten Prinzipien der Rezeptorcharakterisierung angewandt wurden:

(1) Vergleich der relativen Wirkstärke verschiedener Agonisten
(2) und Gebrauch von mehr oder weniger selektiven Antagonisten.
Offen blieb allerdings bis heute die Frage, ob Alpha- und Beta- Rezeptoren unterschiedliche Membranproteine oder verschiedene Konformationszustände desselben Proteins darstellen.

In weiteren pharmakologischen Untersuchungen stellte man fest, daß die pharmakologische Spezifität der alpha- und beta-adrenergen Rezeptoren von Gewebe zu Gewebe variiert. Bei der Untersuchung einiger beta-blockierender Substanzen wie z.B.

Methoxaminanaloga, Butoxamin etc. stellte sich heraus, daß diese zwar die Vasodilatation antagonisieren aber keinen Einfluß auf die beta-adrenerg ausgelöste Stimulation des Herzens haben. Die Arbeitsgruppe von Lands (94, 95) untersuchte eine Reihe von Katecholaminen hinsichtlich der verschiedenen durch beta-adrenerge Stimulation induzierten physiologischen Antworten. Bei der Aufstellung einer Rangfolge dieser Pharmaka bezüglich ihrer Wirkung entdeckten sie zwei Hauptgruppen und postulierten, daß diese die Existenz zweier beta-adrenerger Rezeptoren widerspiegeln, die sie Beta_1 - und Beta_2 - Rezeptoren nannten. Die beta-adrenergen Rezeptoren, die durch Isoprenalin dreimal stärker stimulierbar waren als durch die äquipotent wirkenden Substanzen Adrenalin und Noradrenalin, wurden als Beta_1 -Rezeptoren bezeichnet. Ihre Stimulation führt z.B. zu einer positiv inotropen und chronotropen Wirkung am Herzen, zur Lipolyse, zur Reninfreisetzung und zu einem erhöhten Augeninnendruck (gesteigerte Kammerwasserproduktion). Rezeptoren, die nach Erregung eine Bronchodilatation, Vasodilatation, Darm- oder Uterusrelaxation hervorrufen, waren ebenfalls durch Isoprenalin am stärksten stimulierbar (100mal stärker als durch Noradrenalin). Adrenalin jedoch wies einen wesentlich größeren Effekt als Noradrenalin auf. Man bezeichnete sie als Beta_2 -Rezeptoren. Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Rezeptortypen liegt also in der ungleichen Ansprechbarkeit gegenüber Noradrenalin. Auch Alpharezeptoren haben gegenüber einer Reihe von Agonisten und Antagonisten unterschiedliche Affinitäten. Alpha_1 -Rezeptoren nennt man die postsynaptischen Rezeptoren, die z.B. für die Kontraktion der glatten Muskulatur verantwortlich sind. Als Alpha_2 -Rezeptoren bezeichnet man solche, die sich an der präsynaptischen Membran sympathischer Nervenendigungen befinden und mittels feed-back-Hemmung die Freisetzung von Noradrenalin beeinflussen (69, 119, 130).

Rezeptortyp	Pharm. Spezifität	Physiologischer Effekt
Alpha-adrenerg	NA > A $\gg$ ISO	Erregung glatter Muskeln
Alpha ₁	(postsynaptisch)	Vasokonstriktion
Alpha ₂	(präsynaptisch)	Hemmung der NA-Freisetzung, zentral ausgelöste Blutdrucksenkung
Beta-adrenerg	ISO > A > NA	Hemmung glatter Muskeln Stimulation des Herzens
Beta ₁	ISO > A = NA	Stimulation des Herzens Steigerung der Lipolyse
Beta ₂	ISO > A $\gg$ NA	Dilatation glatter Muskeln von Bronchien, Gefäßen, Darm und Uterus, Steigerung der Glykogenolyse

Tab.1

Klassifikation adrenerger Rezeptoren

A = Adrenalin ISO = Isoprenalin NA = Noradrenalin

Um die postulierten Betarezeptoren besser zu charakterisieren, entwickelte man Substanzen, die möglichst selektiv nur Beta₁- oder Beta₂- Rezeptoren beeinflussen sollten. Man glaubte, damit Pharmaka gefunden zu haben, die selektiv z.B. bei der Therapie kardialer Arrhythmien, Angina-pectoralis-Beschwerden oder des Bronchialasthmas eingesetzt werden könnten, ohne unerwünschte Nebenwirkungen zu haben. Als Beta₁-Agonisten entwickelte man z.B. Dobutamin, Tazolol und Prenalterol, Substanzen, die überwiegend positiv inotrop und chronotrop wirken und nur zu einer geringen Vasodilatation führen. Des weiteren synthetisierte man Beta₁-Antago-

nisten (Practolol, Metoprolol, Atenolol), Beta₂-Agonisten (Salbutamol, Soterenol, Fenoterol) und Beta₂-Antagonisten (Butoxamin, H 35/25, IPS 339). Aber schon bald erkannte man, daß all diese Substanzen für den jeweiligen Rezeptortyp nur relativ spezifisch sind und - wenn auch in wesentlich geringerem Maße - gleichfalls am entgegengesetzten Rezeptortyp Wirkung entfalten. Man dachte auch zunächst, daß in einem bestimmten Organ nur einer der beiden Betarezeptoren vorhanden wäre oder daß jedes einzelne Organ einen spezifischen Rezeptortyp besäße (3). Andere Autoren (118, 144) hingegen postulierten, daß an einem Organ beide Betarezeptoren vorhanden sein können. Brittain (26) konnte z.B. demonstrieren, daß der Beta₂- Agonist Salbutamol bei Ratten und Meerschweinchen einen größeren Einfluß auf die Herzfrequenz als auf die Kontraktionskraft hat. Er schloß daraus, daß an den untersuchten Herzen zwei Rezeptoren - einer, der für die Herzfrequenz, ein anderer, der für die Kontraktilität verantwortlich ist - existieren müßten. Carlsson (35) berichtete, daß der beta₁-selektive Antagonist Practolol mehr Einfluß auf den positiv chronotropen Effekt hatte, wenn dieser durch den relativ selektiven Beta₁-Agonisten Noradrenalin ausgelöst war, als wenn er durch den nichtselektiven Agonisten Adrenalin hervorgerufen worden war. Andererseits beeinflusste der beta₂-selektive Antagonist H35/25 die durch Adrenalin induzierte chronotrope Wirkung stärker. Brittain's (26) Vermutung der Coexistenz beider Betarezeptortypen würde somit bestätigt und insofern noch erweitert, daß man zwei Rezeptoren (Beta₁ und Beta₂) für einen einzigen Effekt (positive Chronotropie) verantwortlich machen konnte. Um zu prüfen, ob nicht mehr als zwei Betarezeptortypen existieren, untersuchten Minneman et al. (118) das Bindungsverhalten einer Reihe selektiver und nicht selektiver Pharmaka an verschiedenen Organen unterschiedlicher Spezies. Sie gingen dabei von der Überlegung aus, daß die pharmakologische Spezifität des jeweiligen Rezeptortypes an jedem Untersuchungsmaterial dieselben Eigenschaften aufweisen müsse. Tatsächlich ergaben sich für jedes Pharmakon jeweils nur zwei

Werte für die Dissoziationskonstante, was darauf hinweist, daß auch nur zwei Rezeptoren vorhanden sind.

Viele weitere Untersuchungen (66, 118, 119, 125) führten zur derzeit allgemeingültigen Vorstellung, daß es nur zwei Beta-rezeptoren gibt, die keine absolute Organspezifität aufweisen, sondern daß nur je nach Organ und Spezies die Beta₁- oder Beta₂- Rezeptoren überwiegen. Durch Untersuchungen mit radioaktiv markierten Liganden wurde es möglich, das relative Verhältnis von Beta₁-/Beta₂- Rezeptoren eines bestimmten Organs zu bestimmen. Das Prinzip besteht darin, die Bindung einer radioaktiv markierten nicht selektiven beta-adrenergen Substanz durch selektiv wirkende Substanzen zu hemmen. Aus den Affinitäten der Substanzen läßt sich unter Verwendung mathematischer (144) oder graphischer (66) oder beider (118) Methoden der relative Anteil beider Rezeptoren berechnen. So z.B. ermittelte man am Rattenherzen ca. 83% Beta₁- und 17% Beta₂- Rezeptoren, an der Rattenlunge hingegen 15% Beta₁-/85% Beta₂- Rezeptoren (118). Für einige Organe unterschiedlicher Spezies konnte dies Verhältnis differenziert werden wie z.B. für die Kaninchenlunge (80% Beta₁/20% Beta₂) (30), das Meerschweinchenherz (rechter Vorhof 75% Beta₁/25% Beta₂, linker Ventrikel 100% Beta₁) (125) etc.. Ob diese Rezeptoren innerhalb dieser Organe auf einer Zelle coexistieren oder auf verschiedene Zellen verteilt sind, ist derzeit noch ungeklärt. Einige der bis heute untersuchten Zellarten weisen nur einen Rezeptortyp auf: so z.B. Astrogliazellen neonataler Ratten (Beta₁) (119), Rattenlymphocyten (Beta₂) (148), Granulocyten (Beta₂) (48, 51, 114) und Lymphocyten (Beta₂) (2, 21, 92, 93, 172) des Menschen. Allerdings konnten an C 6 Gliomzellen Beta₁- und Beta₂- Rezeptoren nachgewiesen werden (66), an Rattenerythrocyten gelang die Quantifizierung ihrer relativen Verteilung (19-25% Beta₁/75-81% Beta₂) (19) und an menschlichen Fettzellen wurden sowohl Beta- (überwiegend Beta₁-, eventuell auch Beta₂-) als auch Alpha-(Alpha₁- und Alpha₂-) Rezeptoren charakterisiert (123).

Zusammenfassend läßt sich sagen:

Adrenerg stimulierende oder hemmende Pharmaka weisen weder absolute Organspezifität noch völlige Betarezeptorselektivität auf. Bei ihrem therapeutischen Einsatz wird es daher stets zu einer Einwirkung auf beide adrenergen Rezeptortypen kommen. Es wird daher verständlich, daß sich die Nebenwirkungen nicht selektiver Beta-Antagonisten (Pindolol, Propranolol) wie z.B. Bronchialobstruktion, Vasokonstriktion oder negative Inotropie bei der Therapie von Angina pectoris oder Hypertonie zwar durch die Verwendung selektiver Substanzen senken jedoch nie ganz ausschalten lassen.

3. Biochemische Charakterisierung adrenerger Rezeptoren

Klassische pharmakologische Untersuchungen an intakten Geweben oder auch an Zellmembranen führten zu dem Konzept von Alpha- und Beta- Rezeptoren. Wenngleich schon in diesen Studien die Existenz von Rezeptorsubtypen wie z.B. Beta₁- und Beta₂- Rezeptoren gefordert wurde, gelang es doch erst durch biochemische Identifizierung von spezifischen Bindungsproteinen, dieses Konzept nachzuweisen.

1974 gelang durch Einführung dreier radioaktiv markierter hochaffiner beta-adrenerger Antagonisten (³H-Propranolol (9), ³H-Dihydroalprenolol (98), ¹²⁵I-Hydroxybenzylpindolol (10)) erstmals der biochemische Nachweis von Betarezeptoren. Diese drei radioaktiv markierten Liganden erfüllten die Kriterien, die für die Bindung eines beta-adrenergen Pharmakons an einen Rezeptor, den Betarezeptor, aufgestellt worden waren (110):

- (1) Es muß sich um eine sättigbare Bindung handeln, da sich auf einer Zelle bzw. an einem Organpräparat nur eine endliche meßbare Zahl von Rezeptoren befinden kann.
- (2) Die Kinetik der Bindung sollte ähnlich der der biologischen Antwort sein, d.h. sie muß schnell erfolgen und schnell reversibel sein.

- (3) Es muß sich um eine stereospezifische Bindung handeln, weil (-)- Enantiomere beta-adrenerger Substanzen eine größere biologische und pharmakologische Wirksamkeit aufweisen als (+)- Enantiomere.
- (4) Die Reihenfolge der Wirksamkeit muß mit der aus physiologischen Untersuchungen gewonnenen Reihenfolge identisch sein.

Folgende drei weitere neu entwickelte radioaktiv markierte Antagonisten, die ebenfalls diese Kriterien erfüllen, haben die Möglichkeit, den Betarezeptor zu charakterisieren, erweitert: ^3H -CGP (134), ^{125}I -Cyanopindolol (54) und ^{125}I -Pindolol (16).

Mittels dieser radioaktiv markierten Liganden konnte an den verschiedensten Organen und Zellen unterschiedlicher Spezies der Betarezeptor charakterisiert und quantifiziert werden: so z.B. an Lunge (148), Herz (148), Gehirn (6) und Niere (28) der Ratte, Herz und Lunge von Meerschweinchen (87, 88), Truthahn- (9, 10, 12, 103) und Frosch- (98) erythrocyten, Rattenerythrocyten (155), Rattenreticulocyten (135, 152), Rattenlymphocyten (148), Zellkulturen von S 49-Lymphomzellen (74) sowie an menschlichen Granulocyten (51, 61, 133) und Lymphocyten (29, 92, 132, 172).

Die Verwendbarkeit der sechs radioaktiv markierten Liganden beruht darauf, daß sie alle eine hohe spezifische Radioaktivität (50-2000 Ci/mmol) und eine starke Affinität zum Betarezeptor (Dissoziationskonstante $K_D \leq 10 \text{ nM}$) aufweisen. Eine fast 1000fach geringere Affinität beta-adrenerger Agonisten macht ihren Gebrauch für spezifische Bindungsexperimente fast unmöglich. Die mit ^3H markierten Agonisten Adrenalin und Noradrenalin zeigten keine sättigbare oder stereoselektive Bindung, sie konnten nicht durch Antagonisten wie z.B. Propranolol aus der Bindung verdrängt werden (113, 163) und diese erwies sich außerdem als irreversibel (99), selbst unter Anwendung starker Säuren oder Hitzedenaturierung (101). Erst durch Zugabe von Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure) und Catechol, einer Substanz, die die unspezifische

Bindung vermindert, gelang die Charakterisierung eines Beta-rezeptors mit dem Agonisten ^3H -Hydroxybenzylisoproterenol, der eine höhere Affinität als andere Agonisten hat (100).

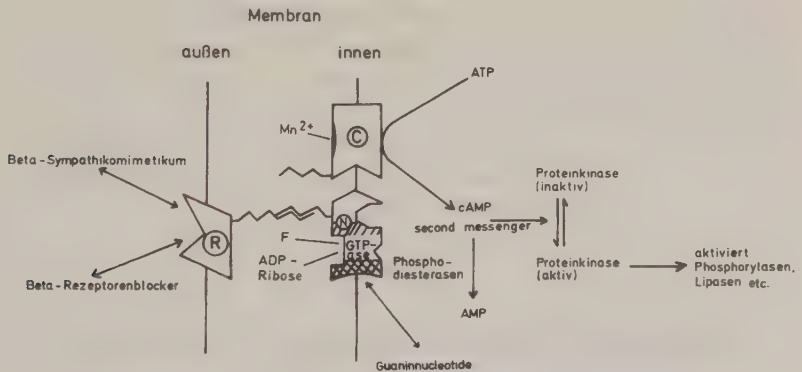
Die Untersuchungen von Sutherland et al. (138) führten zu grundlegenden Erkenntnissen über das Prinzip von Hormonwirkungen auf Zellen. Sie beobachteten, daß die durch Adrenalin und Glucagon bewirkte Glykogenolyse durch eine unter ATP- (Adenosintriphosphat) und Mg^{2+} - Verbrauch aktivierte Phosphorylase ausgelöst war und nur unter Anwesenheit von Zellhomogenat ablief. Die unter ATP-Verbrauch entstandene und für die Aktivierung der Phosphorylase nötige Substanz wurde als cAMP identifiziert (107). cAMP entsteht aus ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat durch Einwirkung der Adenylatzyklase. Erst später stellte man fest, daß das cAMP nicht direkt die Phosphorylase sondern unmittelbar eine Proteinkinase (166) aktiviert, die dann zur Aktivierung verschiedener Enzyme wie z.B. Phosphorylasen und Lipasen führt und schließlich eine Änderung des Zellmetabolismus bewirkt. Man stellte sich vor, die katalytische Seite des Enzyms befände sich an der Membraninnenseite, der Rezeptorteil an der Außenseite. Besetzung des Betarezeptor durch einen Agonisten hat eine Stimulierung der Adenylatzyklase zur Folge. Die Bindung eines Antagonisten hemmt diese Enzymaktivierung, indem sie aufgrund meist höherer Affinität die betamimetische Substanz verdrängt.

Rodbell (140) und Jacobs (77) konnten zeigen, daß die Adenylatzyklase das gemeinsame Endglied mehrerer Rezeptoren darstellt und sowohl von jedem einzelnen Hormon wie auch von mehreren zusammen (wie z.B. Katecholaminen, Glucagon, ACTH und Sekretin) nur bis zu ihrem Maximum stimuliert werden kann. Rezeptor und Adenylatzyklase müßten demnach unterschiedliche Moleküle sein.

Tatsächlich konnten Orly und Schramm (127) beweisen, daß die jeweiligen Hormonrezeptoren und die Adenylatzyklase verschiedene Moleküle sind. Anderen Autoren (105) gelang es, Betarezeptor und Adenylatzyklase nach vorheriger Einwirkung

von Detergentien (z.B. Digitonin) mittels Gelfiltration und Dichte-Gradienten-Zentrifugation oder Chromatographie zu trennen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß beide Moleküle Endprodukte verschiedener Gene sind (74). Die Ergebnisse von Rodbell (140) bestätigten die Überlegung, daß das Betarezeptor-Adenylatzyklase-System aus drei Komponenten besteht:

- (1) Betarezeptor (R),
- (2) Regulatorischer Einheit (N) der Adenylatzyklase mit dem guaninnukleotidbindenden Protein, an dem auch F^- , Vanadat und ADP-Ribose angreifen und
- (3) Katalytischer Einheit (C) der Adenylatzyklase.



Schematische Darstellung des Beta-Rezeptor-gekoppelten-Adenylatzyklasesystems

(R = β -Rezeptor, N = Regulatorische Einheit (= Guaninnukleotid-Bindungsprotein),
C = Katalytische Einheit)

Abb. 1

Schematische Darstellung des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems

Bei weiterer Analyse der Kopplung zwischen hormonbesetztem Rezeptor und Adenylatzyklase (97, 104) entwickelte man folgendes derzeitiges Modell über die Funktion des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems (157):

Ein beta-adrenerger Agonist bindet an den Betarezeptor und induziert die Bildung eines hochaffinen Komplexes, bestehend aus dem Liganden, dem Rezeptor und dem guaninnukleotidbindenden Protein. Konsekutiv wird GDP (Guanosin-5'-diphosphat) vom guaninnukleotidbindenden Protein abgespalten und ein GTP- (Guanosin-5'-triphosphat) Molekül kann sich an diesen Komplex anlagern. Diese Anlagerung führt zu einer Dissoziation des gesamten Komplexes in freien Liganden, Rezeptor und einer Verbindung aus dem Guaninnukleotidbindungsprotein mit GTP. Das Guaninnukleotidbindungsprotein mit dem gebundenen GTP lagert sich an die katalytische Einheit der Adenylatzyklase, wodurch ATP in cAMP gespalten wird. Gleichzeitig wird durch eine GTPase auf dem Regulatorprotein GTP in GDP bzw. GMP überführt (157).

Derzeit kann man Betarezeptor und guaninnukleotidbindendes Protein molekular darstellen, was für die katalytische Einheit noch nicht möglich ist (157).

4. Biologische und pharmakologische Beeinflußbarkeit des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems

Durch die Möglichkeit, den Betarezeptor biochemisch darzustellen, konnten auch Regulationsmechanismen der Rezeptorfunktion untersucht werden. Hormone und Pharmaka sind in der Lage, die Funktion des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems zu verändern, was prinzipiell auf jeder Stufe des Systems geschehen kann:

- (1) Eine Zu- oder Abnahme der Rezeptordichte wäre denkbar.
- (2) Die Affinität des Rezeptors gegenüber dem Liganden könnte sich z.B. aufgrund einer positiven oder negativen Kooperativität verändern.

- (3) Die Adenylatzyklase könnte in ihrer Molekülmenge schwanken.
- (4) Ein unterschiedlicher Wirkungsgrad der Kopplung von Rezeptor und Adenylatzyklase wäre denkbar.
- (5) Die Aktivität der Phosphodiesterase könnte verändert sein.

So z.B. könnte sich eine erhöhte Rezeptorenzahl folgendermaßen auf die biologische Antwort auswirken:

- (a) Eine Verdopplung der Rezeptorenzahl würde zu einer Verdopplung des biologischen Effektes führen, wenn eine maximale biologische Antwort auch die maximale Besetzung aller vorhandenen Rezeptoren erforderte (d.h. keine "spare receptors" vorhanden wären) und die Zahl an Adenylatzyklasemolekülen nicht begrenzt wäre.
- (b) Unter der Bedingung, daß "spare receptors" existieren und die Effektmoleküle begrenzt sind, bliebe die maximale Antwort des Systems zwar gleich, sie würde aber schon durch niedrigere Konzentrationen des Liganden ausgelöst, was man einen hypersensitiven Zustand genannt hat.

Auch Kombination dieser Mechanismen wäre vorstellbar.

Auch der Betarezeptor unterliegt ähnlichen Steuerungsmechanismen. Inkubiert man Froscherythrocyten mit Isoprenalin, so nimmt die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase ab, was mit einem Verlust der hochaffinen Form des Betarezeptors verbunden ist (169). Diesen Prozeß nannte man Desensibilisierung. Chuang und Costa (141) beobachteten an mit Isoprenalin inkubierten Froscherythrocyten, daß die membrangebundenen Betarezeptoren zahlenmäßig abnahmen aber in einem dazu korrelierenden Maße intrazellulär als ^3H -Dihydroalprenolol-Bindungsstellen nachweisbar waren. Dieser Vorgang war von der cAMP-Produktion abhängig, woraus sich erklären ließe, daß Antagonisten, die keine cAMP-Produktion bewirken, die Rezeptordichte auch nicht verminderten. Neuere Untersuchungen von Su (159) an Astrocytomzellen weisen darauf hin, daß die Agonisten-induzierte Desensibilisierung

mit einer schnell verlaufenden Entkopplung des Betarezeptor-Agonisten-Adenylatzyklase-Komplexes verbunden ist.

Folgendes Modell wird heute für die Agonisten-induzierte Desensibilisierung des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems diskutiert (157, 159):

Die Inkubation des Betarezeptors mit einem Agonisten führt zunächst zu einer Modifikation der Rezeptorfunktion, so daß sich der Rezeptor nicht mehr an die regulatorische Einheit der Adenylatzyklase anlagern kann, was allerdings reversibel ist. Der Rezeptor oder die ihn umgebenden Membranmoleküle erfahren dann eine Konformationsänderung, die z.B. einer Endocytose entsprechen könnte. Nach längerer Inkubation mit dem Agonisten ändert sich das Bindungsverhalten, da in diesem Zustand auch keine Antagonisten mehr gebunden werden. Auch dieser Vorgang ist reversibel und unabhängig von der Proteinsynthese der Zelle. Die Autoren (157, 159) vermuten, daß die durch Endocytose intrazellulär verlagerten Rezeptormoleküle eventuell im Golgi-Apparat "erneuert" und dann wieder in die Plasmamembran eingeschleust werden könnten.

Betarezeptoren werden aber nicht nur homolog durch Katecholamine beeinflußt, sondern auch andere physiologische oder pharmakologische Faktoren können ihre Zahl und Eigenschaften regulieren.

An Leberzellen von Ratten, denen die Nebennieren entfernt worden sind, nimmt die Dichte beta-adrenerger Rezeptoren um ca. das 3-5fache zu, was durch Glucocorticoidgabe aufhebbar ist (173). Wie man in Versuchen an hyper- und hypothyreoten Ratten feststellen konnte, üben auch Schilddrüsenhormone regulative Einflüsse auf das System aus, wobei die Ergebnisse allerdings sehr widersprüchlich sind. Einige Autoren fanden eine Erhöhung der Rezeptorenzahl (171, 89, 108) oder der Aktivität der Adenylatzyklase (20), andere eine gleichzeitige Zunahme der Rezeptorenzahl und der Enzymaktivität (39, 171), wieder andere berichten von einer normalen Beta₂- bei erhöhter Beta₁-Rezeptorenzahl (148), ja sogar eine Zunahme beta- auf Kosten alpha-adrenerger Rezeptoren wird disku-

tiert (91). Ähnlich heterogen sind die Ergebnisse an hypothyreoten Tieren (31, 91).

Primäre Störungen des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems können auch distal vom Rezeptor, d.h. an der regulatorischen oder der katalytischen Einheit der Adenylatzyklase lokalisiert sein.

Pseudohypoparathyreoidismus nannte Albright (5) ein erbliches Tetaniesyndrom mit zerebralen Anfällen, Kleinwuchs, Kurzfingerigkeit, Vollmondgesicht und leichtem Schwachsinn, bei dem die Hypocalcämie zwar mit Ca^{2+} , nicht aber mit Parathormon korrigierbar ist, woraus er schloß, daß ein Nichtansprechen der Zielorgane auf Parathormon vorläge. Spiegel et al. (156) gelang es, an Erythrocyten von Patienten mit diesem Syndrom nachzuweisen, daß die regulatorische Einheit der Adenylatzyklase um ca. 50% vermindert ist.

Am Truthahnerythrocyten (36) konnte gezeigt werden, daß Cholera toxin die Katecholamin-stimulierte GTP'ase hemmt, dadurch die Adenylatzyklase stimuliert und so zu einer cAMP-Anreicherung führt. Cholera toxin wirkt an der ins Lumen gerichteten Membran der Dünndarmepithelien. In diesen kommt es zu einer Konzentrationserhöhung von cAMP, woraufhin die Dünndarmzellen in gesteigertem Maße Flüssigkeit und Elektrolyte sezernieren.

5. Untersuchungen des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems an menschlichen Organen und Zellen

Auch an menschlichen Blutzellen wie Granulocyten (43, 51, 61), Lymphocyten (29, 92, 132, 172) und Thrombocyten (69), Fettzellen (18), kultivierten Fibroblasten (115), Lungen- (53, 78), Plazenta- (151), Uterus- (68) und Gehirn- (109) Geweben gelang es, Alpha- und Beta-Rezeptoren darzustellen.

Für klinische Untersuchungen ist es notwendig, ein Zell- oder Gewebesystem zu finden, das leicht und ständig wiederholbar gewonnen werden kann. Es bot sich daher an, Blutzellen zu untersuchen.

Mittels der nicht selektiven radioaktiv markierten Liganden ^3H -Dihydroergocryptin und ^3H -Phentolamin wies man an Thrombocyten Alpharezeptoren nach (69). Stimuliert man diese durch nicht physiologische Konzentrationen an Adrenalin (10^{-6} M), so wird die Adenylatzyklase gehemmt, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt an, und es findet eine Degranulation und Aggregation der Thrombocyten statt. Beim Vergleich der Affinitäten verschiedener alpha-adrenerger Pharmaka, von denen alpha₂-selektive Liganden (z.B. ^3H -Yohimbine) die größere Affinität aufweisen, läßt sich vermuten, daß es sich um einen Alpha₂-Rezeptor handelt (123).

Granulocyten und Lymphocyten besitzen, wie man aus dem Vergleich der Affinitäten selektiv bindender Substanzen weiß, Beta₂-Rezeptoren, nach deren Stimulation die Mitose von Lymphocyten angeregt ist und die Freisetzung von Hydrolasen sowie die Phagocytose und Chemotaxis von Granulocyten gehemmt sind (24, 123).

Bei der Untersuchung der Rezeptoren dieser Zellen, die letztlich dazu dienen soll, eine Aussage über die Reaktionsweise des gesamten Organismus zu gewinnen, geht man davon aus, daß sie repräsentativ die Beeinflussung adrenerger Rezeptoren anderer Gewebe wie z.B. von Herz, Lunge und Gefäßen reflektieren, an denen das adrenerge System eine wichtige Funktion für den Gesamtorganismus ausübt. Insulinrezeptoren von Monocyten z.B. sind ein gut peripher erreichbares Korrelat von Insulinrezeptoren an Leber-, Fett- und Muskelgewebe (13). Allerdings muß man bedenken, daß Insulin ein im Blut zirkulierendes Hormon ist, wohingegen Katecholamine sowohl Hormone als auch Neurotransmitter sind. Blutzellen sind aber im Gegensatz zu den vegetativ innervierten Organen lediglich den zirkulierenden Hormonen ausgesetzt. Dennoch, die an diesen Blutzellen erhobenen Befunde haben sowohl für das Verständnis einer Reihe von Erkrankungen als

auch für die Therapie mit Pharmaka wie z.B. Katecholaminanaloge oder beta-blockierender Substanzen Bedeutung erlangt.

Szentivanyi (160) vermutete erstmals, daß atopische Erkrankungen wie z.B. das Asthma bronchiale pathogenetisch auf einem Mißverhältnis adrenerger Rezeptoren mit einer Zunahme von Alpharezeptoren (Stimulation resultiert in Bronchokonstriktion und Histaminausschüttung) und einer verminderten Zahl an Betarezeptoren (vermitteln eine Bronchodilatation) beruhen könne. Dies ließ sich tatsächlich an Lungengewebe von Meerschweinchen, bei denen experimentell ein Asthma bronchiale induziert worden war, beweisen (15). Man untersuchte Lymphocyten und Granulocyten asthmatischer Patienten, wobei man jedoch nur an den Lymphocyten eine verminderte Rezeptorenzahl feststellen konnte (147), die unabhängig von einer Therapie mit agonistischen Pharmaka war. Bei einer Untersuchung von Asthmatikern, die einer chronischen Therapie mit betasympathomimetischen Substanzen unterlagen, waren die Zahl der Betarezeptoren und die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase von Granulocyten und Lymphocyten (43) vermindert, was eine mögliche Erklärung für die abnehmende Wirksamkeit dieser Pharmaka bei gleichbleibend hoher Dosierung darstellt. Nach Verabreichung von Methylprednisolon stieg innerhalb kurzer Zeit die Rezeptorenzahl der Lymphocyten wieder auf den Ausgangswert an (60, 161). Auch eine Abnahme der Rezeptordichte und bzw. oder der Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase von menschlichen Lymphocyten nach Isoprenalingabe in vitro und in vivo ist möglich (84).

Patienten mit kongestiver Kardiomyopathie, bei denen im Blut erhöhte Katecholaminspiegel meßbar waren, wiesen gegenüber Normalpersonen eine Reduktion ihrer lymphocytären Betarezeptorenzahl auf (41). Die Therapie mit dem Beta-Agonisten Pirbuterol führte nur initial zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik. Bei chronischer Gabe entwickelten die Patienten eine Toleranz und der Therapieerfolg

war nicht mehr nachweisbar. Gleichzeitig nahm die Zahl der Betarezeptoren ihrer Lymphocyten weiter ab (41).

Auch eine gegenteilige Regulation, nämlich eine Hypersensibilisierung z.B. nach Beta-Blocker-Therapie wurde beobachtet. Nach fünftägiger Gabe von Propranolol erhöhte sich die Zahl der lymphocytären Betarezeptoren um 30-50%. Nach Absetzen des Antagonisten konnte schon nach einem Tag kein Propranolol mehr im Blutplasma gemessen werden, die Rezeptoren sanken jedoch erst nach vier Tagen auf ihren Ausgangswert ab. Während dieser Zeit beobachtete man klinisch eine erhöhte Sensitivität des kardiovaskulären Systems gegenüber Katecholaminen. Es wird daher verständlich, daß eine langdauernde Therapie mit Beta-Blockern nicht abrupt abgebrochen werden sollte. Pectanginöse Beschwerden, kardiale Arrhythmien und Myokardinfarkte sind nach plötzlichem Absetzen von Propranolol beschrieben worden (63). Allerdings muß nicht jeder Beta-Blocker diese Nebenwirkungen aufweisen. So stellten Molinoff und Aarons (120) fest, daß Pindolol, ein Beta-Blocker mit intrinsischer Aktivität, nicht zu einer Erhöhung sondern zu einer Reduktion der Betarezeptoren auf den Lymphocyten führt. Es könnte daher sein, daß abruptes Absetzen dieser Substanz weniger oder keine Nebenwirkungen hätte.

Fraser et al. (58) postulierten dagegen, daß endogene Katecholamine ständig reziprok zu der Höhe ihrer Plasmaspiegel die Betarezeptoren von Granulocyten und Lymphocyten steuern. Propranolol, das die sympathische Aktivität hemmt, blockiert damit auch diesen negativ regulierenden Effekt der Katecholamine, was sich dann in einer erhöhten Rezeptordichte dieser Zellen ausdrückt, die in dieser Untersuchung aber nur bis maximal 48 Std. nach Ende der Propranololgabe fortbestand.

Bei Patienten mit orthostatischer Hypotonie, die erniedrigte Katecholaminspiegel aber eine erhöhte klinisch meßbare Ansprechbarkeit des Organismus gegenüber diesen besitzen, konnte festgestellt werden, daß Alpha- und Beta-

Rezeptoren von Thrombocyten und Lymphocyten vermehrt sind (49, 71).

Mit zunehmendem Alter nimmt die Sensitivität des menschlichen Herzens z.B. gemessen an der inotropen Antwort gegenüber Sympathomimetika und Sympathikolytika ab (165). Die Katecholaminspiegel im Blut dagegen steigen mit dem Alter an (92). Man vermutete daher, daß das kardiale Betarezeptor-Adenylatzyklase-System des älteren Menschen bezüglich Rezeptordichte und/oder Sensitivität gegenüber Agonisten bzw. Antagonisten eine Änderung erfahren haben könnte und diese eventuell eine allgemeine Reaktion des gesamten beta-adrenergen Systems des alternden Menschen darstelle. Immerhin zeigen eine Reihe von Hormonen wie z.B. Corticoide, Androgene, Insulin, Acetylcholin, Dopamin und Gonadotropine bei Tieren und teilweise auch im menschlichen Organismus eine verminderte Wirksamkeit, die mit der Alterung dieser Organismen und einer Abnahme der spezifischen Rezeptoren in den jeweiligen Zielorganen korreliert (143). So z.B. nimmt die Wirkung von Corticoiden auf menschliches Lebergewebe und Lungenfibroblasten mit zunehmendem Alter ab, was von einer Reduktion der spezifischen Rezeptoren begleitet ist (143).

Auch andere Spezies wie z.B. Hund und Ratte reagieren mit zunehmendem Alter weniger sensitiv auf Katecholamine. Man untersuchte daher, an welchen Einheiten des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems solche altersbedingten Veränderungen meßbar sind. An Rattenfettzellen fand man eine Abnahme der Betarezeptorenzahl (65), die aber am Rattenherzen, das lediglich eine alterskorrelierende Reduktion der Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase aufwies, nicht nachvollziehbar war (126).

Die diesbezüglichen Untersuchungen am menschlichen Lymphocyten als möglichem Repräsentanten des beta-adrenergen Systems innerer Organe sind widersprüchlich: sie berichten sowohl von einer Abnahme (152) als auch von einem Gleichbleiben der Betarezeptordichte (25, 27, 50, 92) bzw. der

Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase (82, 83, 85).

Eine genaue Untersuchung dieses Problems ist außerdem deswegen von besonderer Bedeutung, da in vielen Untersuchungen des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems unter verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen häufig junge Probanden als Kontrollkollektiv zu meist älteren Patienten herangezogen werden. Eventuell bestehende altersbedingte Unterschiede könnten daher als krankheitsbedingt fehlinterpretiert werden.

Eine gegenteilige Reaktionslage des Organismus scheint bei der Hyperthyreose vorzuliegen. Viele klinische Symptome einer hyperthyreoten Stoffwechsellage ähneln denen einer durch Katecholamine ausgelösten Stimulation wie z.B. erhöhte Kontraktilität des Herzens (erhöhtes Schlagvolumen, vergrößerte Blutdruckamplitude), Tachykardie, gesteigerte Erregbarkeit des Reizleitungssystems, erhöhte Wärmeproduktion, Tremor, Glykogenolyse, Lipolyse, Gewichtsverlust und zentrale Erregbarkeitssteigerung. Dies hat dazu veranlaßt, nach einer Beziehung zwischen Schilddrüsenhormonen und adrenergem System zu suchen. Derartige Studien haben sich unter anderem deshalb als schwierig erwiesen, weil der eigentliche Wirkungsmechanismus der Schilddrüsenhormone bisher nur teilweise aufgeklärt worden ist. Derzeit stellt man sich ihre Wirkung folgendermaßen vor:

Trijodthyronin und Thyroxin sind im Serum an Präalbumine, Albumine und zum weitaus größten Teil an das Thyroxinbindende γ -Globulin gebunden und liegen zu einem ganz geringen Teil frei vor. Die freie Form wird von den Zellen aufgenommen, wobei Thyroxin durch zwei aktiv gesteuerte Deiodasen entweder zum aktiven 3,3',5-Trijodthyronin oder zum metabolisch fast inerten 3,3',5'-Trijodthyronin (= reverse T_3) und anderen Metaboliten umgebaut wird. Das aktive 3,3',5-Trijodthyronin wird von cytoplasmatischen, mitochondrialen und nukleären Rezeptoren gebunden. Im Nukleus bewirkt es eine Modulation der Transkription des genetischen Codes (wahrscheinlich über Einwirkung auf genetisch

codierte Regulatorproteine) und eine gesteigerte Produktion von m-RNA (messenger-Ribonukleinsäure), was schließlich zur Proteinsynthese führt. Diese Schilddrüsenhormon-induzierte Neusynthese von Protein wird wahrscheinlich ergänzt durch die rasche Wirkung der beiden Hormone auf den Energieumsatz der Mitochondrien. Andere mögliche Effekte wie z.B. eine Vermehrung der $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase-Moleküle, die Methylierung mikrosomaler Membranen, die Inkorporation in den Tyrosinstoffwechsel oder eine Anreicherung in Nervenendigungen sind sehr umstritten. Außerdem existieren auch in der Plasmamembran hochaffine T_3 -Rezeptoren, deren Funktion ungeklärt ist.

Einige Untersuchungen weisen darauf hin, daß hyperthyreote Personen eine erhöhte, vor allem kardiale Ansprechbarkeit gegenüber Katecholaminen besitzen. So z.B. stellte man nach Verabreichung von Adrenalin oder Noradrenalin überhöhte Anstiege von systolischem Blutdruck, Herzfrequenz, Gastrin- und cAMP- Spiegeln bei hyperthyreoter Stoffwechsellage fest (64). Andere Autoren hingegen konnten keine erhöhte kardiale Sensitivität gegenüber Katecholaminen beobachten (122). Auch Untersuchungen über die Auswirkungen von Beta-Antagonisten, die bei der Hyperthyreose therapeutisch eingesetzt werden und zur Reduktion der Herzfrequenz, der Nervosität, des Tremors und der Hyperhidrosis führen können, sind widersprüchlich. Einige Autoren berichten über diese therapeutischen Effekte, andere können diese nicht verifizieren oder beobachten nur eine auch bei euthyreoten Personen nachweisbare Wirkung (122).

Geht man von der Möglichkeit aus, daß eine Schilddrüsenhormon-bedingte beta-adrenerge Überstimulation existieren kann, so sind grundsätzlich zwei Interaktionen denkbar:

- (1) Schilddrüsenhormone beeinflussen die Katecholaminspiegel.

Für diese Annahme hat sich kein Anhalt gefunden, da weder Plasma- oder Urinkonzentrationen noch der Umsatz der Katecholamine bei hyperthyreoter Stoffwechsellage erhöht gefunden wurden; es wurden sogar eher

niedrige Konzentrationen gemessen (64).

- (2) Schilddrüsenhormone verändern die Ansprechbarkeit der Zellen gegenüber der Einwirkung von Katecholaminen. Dies könnte auf Veränderungen der Zahl oder Affinität adrenerger Rezeptoren oder der ihnen nachgeschalteten Adenylatzyklaseaktivität zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse in der Literatur (20, 39, 148, 171, 173) sind sehr divergent. An Lymphocytenmembranen hyperthyreoter Patienten stellte Williams (170) keine Änderung der Zahl oder Affinität von Betarezeptoren fest. Ginsberg (64) hingegen berichtet von einer Verdoppelung der Rezeptorenzahl dieser Zellen im hyperthyreoten Zustand.

Wir untersuchten daher, ob die Betarezeptoren intakter Lymphocyten hyperthyreoter Patienten hinsichtlich Zahl und Affinität eine Veränderung aufweisen.

6. Ziel dieser Arbeit

Zur Charakterisierung des Betarezeptors intakter menschlicher Lymphocyten sollen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- (1) Darstellung und Quantifizierung einer spezifischen Bindung des radioaktiv markierten Liganden (+)-¹²⁵I-Cyanopindolol an intakte menschliche Lymphocyten.
- (2) Abhängigkeit der Zahl und der Affinität des Betarezeptors intakter menschlicher Lymphocyten von Alter und Geschlecht.
- (3) Einfluß einer hyperthyreoten Stoffwechsellage auf die Zahl und Affinität der Betarezeptoren dieser Zellen.

B. MATERIAL UND METHODIK

1. Material

Für die radioaktive Markierung des (+)-Cyanopindolol bezogen wir 2 mCi Na¹²⁵I in 20 µl 0,1 M NaOH vom Radiochemical Centre Amersham-Buchler, D-3300 Braunschweig.

(+)-Cyanopindolol erhielten wir von Dr. Engel, Sandoz Basel. Die folgenden Substanzen wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

(-)-Propranolol und (+)-Propranolol (ICI Pharma, Plankstadt),
(-)-Isoprenalin-d-bitartrat (Boehringer, Ingelheim),
(-)-Adrenalinhydrochlorid (Hoechst, Frankfurt) und (-)-Noradrenalin (Serra, Heidelberg).

Weiterhin wurden käuflich erworben:

Ammoniumformiat pH 8,5 und Chloramine T (= N-chlor-p-toluolsulfonsäureamid) von Sigma Chemie, D-8028 Taufkirchen,
Ficoll-Isopaque -Lösung (D = 1,077) von der Apotheke der Kliniken der Universität München, D-8000 München,
Haematology Lysing Hemoglobin und Isoton-Detergenz von der Firma Clinicon, D-6800 Mannheim,
Glasfaserfilter GF/C Whatman No. 2571 von der Firma Whatman,
Polypropylen-Röhrchen No. 55518 von der Firma Sarstedt.

Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden von E. Merck, D-6100 Darmstadt bezogen.

2. Isolierungsmethode der mononukleären Zellen aus menschlichem Blut

Um den Betarezeptor an menschlichen Lymphocyten zu charakterisieren, muß man diese zunächst aus dem Blut isolieren. Dazu findet man in der Literatur unterschiedliche Modifikationen der Präparationsmethode nach Böyum (22), durch die aus Blut mononukleäre Zellen, das sind größtenteils Lymphocyten und auch Monocyten, isoliert werden. (Anmerkend sei erklärt, daß es daher exakter ist, die so isolierten Zellen als mononukleäre Zellen zu bezeichnen, wie es in den Teilen B (MATERIAL UND METHODIK) und C (ERGEBNISSE UND DEREN BE-SRECHUNG) geschieht. Zum einheitlicheren Vergleich mit der Literatur werden im Teil D (DISKUSSION) mononukleäre Zellen und Lymphocyten bedeutungsmäßig gleichgesetzt.) Die von Autor zu Autor sich ändernden Präparationsvarianten spiegeln die Schwierigkeit wider, aus dem menschlichen Blut eine möglichst reine Lymphocytensuspension zu gewinnen. Bei den eigenen Untersuchungen wurde die Böyumsche Methode (22) gering modifiziert.

Gesunden ffreiwilligen Probanden und Patienten mit hyperthyreoter Stoffwechsellage wurden 40-150 ml Blut durch Venenpunktion entnommen. (Die Bestimmung der Schidddrüsenhormonwerte, Gesamtthyroxin und freies Trijodthyronin, wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. Vogt, Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, München, durchgeführt.)

Zur Antikoagulation des Blutes wurden zwei Verfahren angewandt:

- (1) Das Blut wurde mit 100 I.E. Heparin/ml Blut versetzt.
- (2) Zur Defibrinierung und quantitativen Entfernung der Thrombocyten (167) wurde das frisch entnommene Blut in einem Erlenmeyerkolben mit Glaskugeln (Durchmesser 3-5 mm) ca. 15-20 min. bei Raumtemperatur vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde es mit gleichem Volumen-anteil eines Phosphatpuffers (6,7 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$,

38 mM NaCl, pH 7,2) verdünnt und die Blut-Puffer-Lösung dekantiert.

Das heparinisierte Blut bzw. das Blut-Puffer-Gemisch wurden dann mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Zwei flüssige Phasen - eine zellhaltige Suspension und ein relativ dichtes Auftrennungsmedium - werden übereinandergeschichtet. Zentrifugiert man dieses Zwei-Phasen-System bei festgelegter Zentrifugalkraft und bestimmter Viskosität des Trennmediums, so ist die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen proportional zu ihrer Größe und der Differenz ihrer Dichte zur Dichte des Umgebungsmediums. Bei gleicher Dichte von Zellen und Umgebungsmedium wird die Sedimentationsgeschwindigkeit Null.

Zur Dichtezentrifugation wurden jeweils 6-8 ml der Blut-Puffer-Lösung über 3 ml Isopaque-Ficoll mit einer Dichte von 1,077 g/ml geschichtet. Isopaque-Ficoll besteht aus einer wäßrigen Lösung des synthetischen Polymers Ficoll 400 (MG: 400000) und Natrium-Metrizoat. Die Ficoll-Isopaque-Flotation trennt die zellulären Elemente des Blutes hauptsächlich in zwei Fraktionen:

- (1) Lymphocyten mit Monocyten und einem Teil basophiler Granulocyten,
- (2) Granulocyten mit Erythrocyten.

Das Blut-Ficoll-System wurde dann 20 min. in Raumtemperatur bei 270 g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation konnte man im Zentrifugenröhrchen vier Schichten (von oben nach unten angegeben) unterscheiden:

- (1) Serum und Thrombocyten,
- (2) Lymphocyten mit Monocyten, die zusammen als mononukleäre Zellen bezeichnet werden, basophile Granulocyten und Thrombocyten,
- (3) Ficoll-Isopaque-Lösung und
- (4) Granulocyten und Erythrocyten.

Mit einer Pasteurpipette wurde zunächst das Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch abgehoben. Dann wurden die mononukleären Zellen ebenfalls mit einer Pasteurpipette abgesogen und

für weitere Waschvorgänge in ca. dem 3-fachen Volumen des Phosphatpuffers suspendiert. Hierbei war sorgfältig darauf zu achten, daß lediglich die weißliche Zellschicht auf dem Flotationsmittel erfaßt wurde. Zuviel mit abgehobene Ficoll-Isopaque-Lösung führt zu einer Verunreinigung mit Granulocyten, zuviel miterfaßtes Serum zu einer Beimengung von Serumproteinen (167).

Die Zell-Phosphatpuffer-Suspension wurde 10 min. bei 130 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand, hauptsächlich aus Thrombocyten und Serumproteinen bestehend, wurde erneut abgehoben und verworfen. Das Zellpellet wurde dann wieder in Phosphatpuffer suspendiert und der Waschvorgang noch zweimal wiederholt.

Nach dem letzten Waschvorgang löste man das Zellpellet in ca. 6 ml Puffer A (140 mM NaCl, 5,5 mM Glucose, 10 mM HEPES (= N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure), pH 7,45) und stellte diese Zellsuspension kurz auf Eis.

Alle im Folgenden beschriebenen Bindungsstudien wurden direkt im Anschluß an die Zellpräparation mit der erhaltenen Zell-Puffer-Suspension durchgeführt.

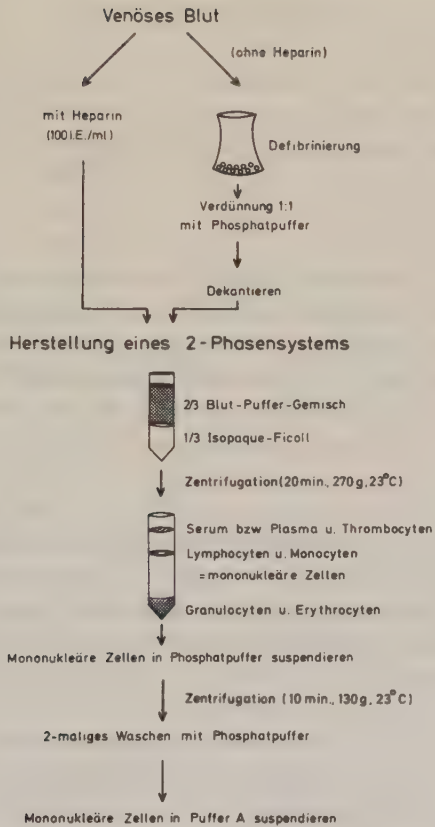


Abb. 2

Isolierung mononukleärer Zellen (schematische Darstellung, Einzelheiten s. Teil B, 2.)

3. Untersuchung der Zellsuspension

Um Aufschluß über die Zusammensetzung der präparierten Zellsuspension zu erhalten, wurden Zellzählungen, morphologische Differenzierung und Vitalitätsprüfung durchgeführt.

3.1. Zählung der Zellen

Mittels eines Zellcounters der Firma Boehringer, Mannheim, (Modell HC 333) wurde die Zellzahl der Zell-Puffer-Suspension bestimmt und das Endvolumen der Zellsuspension so bemessen, daß ca. $3-8 \times 10^6$ Zellen/ml vorhanden waren.

Da wir durch Modifikation der ursprünglichen Methode von Böyum (22) die Zahl der Thrombocyten in der endgültigen Zellsuspension zu verringern suchten, zählten wir die Thrombocyten vergleichend in Zellsuspensionen, die aus heparinisiertem und die aus defibriniertem Blut hergestellt worden waren. Dazu wurden zunächst eventuell vorhandene Erythrocyten hämolysiert, dann die Thrombocyten in der Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop (Objektiv 40:1) ausgezählt (139).

3.2. Morphologische Differenzierung der Zellen

Mittels der Sedimentkammermethode (Cytozentrifuge der Firma Shandon) beschichteten wir plangeschliffene Objektträger mit der Zellsuspension.

Diese Präparate wurden dann nach Pappenheim gefärbt, indem man 6 min. May-Grünwald-Lösung einwirken ließ, den Objektträger dann kurz mit Aqua destl. abspülte und 3 min. in Aqua destl. stehen ließ, dieses abkippte und daraufhin 20 min. Giemsa-Gebrauchslösung (= Giemsa-Stammlösung 1:33 mit Aqua destl. verdünnt) einwirken ließ. Anschließend wurde der Ausstrich nochmals mit Aqua destl. abgespült und dann schräg stehend an der Luft getrocknet (139). Die so angefertigten Präparate wurden unter einem Mikroskop (Leitz 100fache Vergrößerung mit Ölimmersion) aufgrund

morphologischer Kriterien differenziert.

3.3. Testung der Vitalität der Zellen

Vor und nach der Inkubationszeit von 75 min. (s. B, 5.) wurde die Vitalität der Zellen durch den Trypanblau-Ausschluß-Test bestimmt. Dazu wurden 0,01 ml Zellsuspension mit 0,005 ml 1% Trypanblaulösung auf einem Objektträger zusammengegeben. Nach 5 min. wurde mit Hilfe eines Häemocytometers unter dem Phasenkontrastmikroskop die prozentuale Anzahl der Zellen ausgezählt, die fähig waren, ihr Cytoplasma frei von der Farblösung zu halten. Diese bezeichnet man als vitale Zellen.

4. Radioaktive Markierung von (+)-Cyanopindolol mit Na¹²⁵Jodid

(+)-Cyanopindolol, ein neu synthetisiertes Derivat des Pindolol, wurde nach der Methode von Hunter und Greenwood (73) mit ¹²⁵Jodid radioaktiv markiert. In der angegebenen Reihenfolge wurden folgende Substanzen in ein Polypropylenröhrchen zusammengegeben:

0,01 ml 13,5 mM HCl, in der 0,02 g (+)-Cyanopindolol gelöst sind,

0,02 ml 0,3 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,6

2 mCi Na¹²⁵Jodid, das in 0,02 ml 0,1 M NaOH gelöst ist und
0,02 ml in Aqua bidestl. gelöstes Chloramin T (0,34 mg/ml).

Dieses Reaktionsgemisch wurde 5 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und die Reaktion durch Zugabe von 0,3 ml wässrig gelösten Na₂S₂O₃ (1 mg/ml) gestoppt. Dann gab man 0,01 ml 1 M NaOH dazu und extrahierte das jodierte Produkt viermal mit 0,3 ml 0,01% Phenol- enthaltenden Äthylacetats. Das in dem Äthylacetat enthaltene jodierte Produkt sammelte man jeweils mit einer Pasteurpipette und trug es auf ein 25 x 40 cm großes Chromatographiepapier (3 mm, Firma Whatman)

auf. Als Laufmittel für die bei 4°C absteigende Chromatographie wurden 0,1 M Ammoniumformiat pH 8,5 und 0,01% Phenol zugegeben. Nach ca. 4 Std. wurde das Chromatogramm in 1 cm breite Streifen zerschnitten und die noch nassen Stücke in je 5 ml 95% Methanol getaucht. Durch Messung der Proben in einem Gammazählgerät (Gamaszint BF 5300 der Firma Berthold, München) mit einer Ausbeute von 67% stellte man fest, daß sich das radioaktiv markierte (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol als enger Gipfel ca. 2-3 cm von der Auftragslinie entfernt befindet, während das unmarkierte (+)-Cyanopindolol 17 cm von der Nulllinie nachweisbar ist. (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol wurde bei -20°C in 95% Methanol gelöst für maximal 8 Wochen aufbewahrt, wobei es nach Angaben des Herstellers noch länger ohne Bindungsverlust haltbar sein soll.

Aus dem in Methanol gelösten (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol stellte man sich eine gebrauchsfertige Verdünnung mit Aqua destl. her und berechnete mittels der in dieser Verdünnung gemessenen Radioaktivität die Menge des darin enthaltenen (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol.

5. Bindungsversuche mit dem radioaktiv markierten beta-adrenergen Antagonisten (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol

Bei den verschiedenen Bindungsexperimenten wurde der radioaktiv markierte Beta-Antagonist (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol mit Zellsuspension (ca. $2-8 \times 10^6$ mononukleäre Zellen/ml) und je nach Fragestellung unterschiedlichen Konzentrationen an Beta-Agonisten und Beta-Antagonisten bei 23°C inkubiert. Dabei dienen 5-10 pM (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol, Puffer B (280 mM NaCl, 5,5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,45) und Aqua destl. als Ansatz, zu dem dann die aufsteigenden Konzentrationen an gewünschten Substanzen (10 pM - 1 mM) gegeben wurden.

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Zellsuspension ge-

startet und in einem Schüttelwasserbad bei 23°C für 75 min. inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden 20 ml eines Puffers C (10 mM Tris-HCl, 0,154 M NaCl, pH 7,4) zugesetzt. Zell-gebundener und freier Ligand wurden durch rasche (30 sec.) Vakuumfiltration getrennt. Die auf dem Filter befindliche an Zellen gebundene Radioaktivität wurde in einem Gammazählgerät mit einer Ausbeute von 67% gemessen.

5.1. Messung der Assoziationsreaktion

Für die Bindungsexperimente wurden ca. 10 pM (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol mit 5 x 10⁶ Zellen/ml Ansatz in Puffer B (280 mM NaCl, 5,5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,45) und Aqua destl. in Polypropylenröhrchen inkubiert.

Beispiel: 0,10 ml	Zellsuspension
0,05 ml	Puffer B
0,03 ml	Aqua destl.
0,02 ml	(+)- ¹²⁵ J-Cyanopindolol
0,20 ml	Gesamtvolumen

Die Inkubation wurde bei 23°C vorgenommen und durch Zugabe der Zellsuspension gestartet. Die Bildungsreaktion des Rezeptor-Liganden-Komplexes wurde zu den jeweils angegebenen Zeiten durch Zugabe von 20 ml Puffer C (10 mM Tris-HCl, 0,154 M NaCl, pH 7,4) und schnelle Filtration (Filteranlage der Firma Millipore GmbH, Neuhausen) über Whatman GF/C Glasfaserfilter gestoppt. Die auf dem trockenen Filter verbliebene Radioaktivität wurde im Gammazählgerät gemessen.

5.2. Messung der Dissoziationsreaktion

Die Dissoziation wurde durch Verdrängung mit einem nicht radioaktiv markierten Antagonisten durchgeführt. Zunächst wurde eine wie unter 5.1. beschriebene Assozia-

tionsreaktion bei 23°C 75 min. lang (Erreichung des Äquilibrium) ausgeführt. Um das ungebundene (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol von dem an den Rezeptor gebundenen Teil zu trennen, wurde der gesamte Ansatz (s. 5.1.) 30 min. bei 550 g in Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Sediment, bestehend aus Zellen und Zell-gebundenem Liganden, wurde in dem gleichen Volumen aufgelöst wie vor der Inkubation.

Die nun folgende Inkubation bei 23°C diente dazu, das an den Rezeptor gebundene (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol aus seiner Bindung zu verdrängen.

Ansatz: 0,10 ml	(+)- ¹²⁵ J-Cyanopindolol-Rezeptor-Komplex
0,05 ml	Puffer B
0,02 ml	10 ⁻⁵ M (-)-Propranolol
0,03 ml	Aqua destl.
0,20 ml	Gesamtvolumen

Diese Verdrängungsreaktion wurde zu den jeweils angegebenen Zeiten gestoppt, indem rasch mit 20 ml des beschriebenen Puffers C verdünnt wurde und das Reaktionsgemisch abfiltriert wurde. Die Messung des Zell-gebundenen (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol erfolgte wie unter 5.1. beschrieben.

5.3. Messung der konzentrationsabhängigen Bindung

Eine kleine Menge Zellsuspension mit ca. $2-8 \times 10^6$ Zellen/ml Ansatz wurde bei 23°C in Puffer B, Aqua destl., 5-10 pM (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol und steigenden Konzentrationen an nicht radioaktiv markierten (+)-Cyanopindolol inkubiert.

Beispiel: 0,10 ml	Zellsuspension
0,05 ml	Puffer B
0,01 ml	Aqua destl.
0,02 ml	(+)- ¹²⁵ J-Cyanopindolol
0,02 ml	(+)-Cyanopindolol
0,20 ml	Gesamtvolumen

Beginn und Ende der Reaktion wurden wie schon unter 5.1. erläutert herbeigeführt, wobei die Inkubationszeit 75 min. betrug, da sich die Reaktion nach dieser Zeit im Äquilibrium befand. Als Äquilibrium der Bindung wurde der Zeitpunkt der maximalen Bindung definiert.

5.4. Messung der unspezifischen Bindung

Zur Messung der unspezifischen Bindung des $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol an mononukleäre Zellen wurde der Reaktionsansatz (s. 5.3.) zusammen mit 10^{-6} M $(-)$ -Propranolol 75 min. lang bei 23°C inkubiert. Die nach dieser Zeit noch meßbare $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol-Bindung wurde als unspezifische Bindung bezeichnet und in allen der unter 5.1. bis 5.3. beschriebenen Experimente von der Gesamtbindung subtrahiert (s. Teil C, I. 2.2.).

5.5. Abtrennung des Zell-gebundenen vom freien Liganden

Zur Trennung von Zell-gebundenem und freiem Liganden gibt es verschiedene Methoden (130) wie z.B. Äquilibrium-Dialyse, Dichtegradientenzentrifugation, Gelfiltration, Präzipitation, Spektraltechnik etc.. Zur Analysierung der Bindung an adrenerge Rezeptoren haben sich aber lediglich zwei Methoden als praktikabel erwiesen: die Ultrazentrifugation (98, 124) und die Filtration (7, 67). Wir bedienten uns der Filtration, da diese schneller (≤ 30 sec.) verläuft als die Ultrazentrifugation (ca. 1-5 min.) und dadurch weniger an nicht gebundenem Liganden eingefangen wird, was die unspezifische Bindung reduziert (130). Das Prinzip besteht darin, daß durch einen Sog (ca. 3-4 atü Unterdruck), der durch eine Vakuumpumpe erzeugt wird, der Inkubationsansatz über einen Glasfaserfilter gesogen wird, sodaß der Zell-Liganden-Komplex wegen seiner Größe auf dem Filter zurückgehalten wird. Puffersubstanzen und ungebundener Ligand passieren das Filter. Um eventuell auf dem Filter zurückgebliebenen ungebundenen Liganden

auszuwaschen , spült man mit Pufferlösung nach. Glasfaserfilter haben sich gegenüber anderen Filterarten besonders bewährt, weil sie größere Mengen an Zellen bzw. membranhaltigen Materials zurückhalten und sie eine große Durchflußrate besitzen, somit also eine wesentlich schnellere Trennung von gebundenem und ungebundenem Liganden erlauben. Dies ist wegen der stets ablaufenden Dissoziationsreaktion wichtig.

6. Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit gezeigten Daten von Bindungsexperimenten stellen Mittelwerte eng korrelierender Dreifachbestimmungen dar. Der Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde mit dem t-Test nach STUDENT durchgeführt (145). Die obligate Prüfung auf Nicht-Normalität wurde nach DAVID durchgeführt (145).

In den Tabellen sind Mittelwerte und die Standardabweichung der Mittelwerte $s_{\bar{x}}$ dargestellt.

C. ERGEBNISSE UND DEREN BESPRECHUNG

I. Charakterisierung einer beta-adrenergen Bindungsstelle an intakten menschlichen mononukleären Zellen

1. Isolierung der mononukleären Zellen aus menschlichem Blut

Um aus Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation Zellen isolieren zu können, muß die Koagulation des Blutes verhindert werden. Dies ist prinzipiell auf verschiedene Weisen möglich:

- (1) durch Hemmung der Aktivität des Thrombins mittels Heparin,
- (2) durch komplexe Bindung von Ca^{2+} , einem Ion, das zum Ablauf der Gerinnung unbedingt nötig ist, mit Hilfe von K- oder Na- ÄDTA (= Äthylendiamintetraacetat), Na-citrat oder Na-oxalat oder
- (3) durch Defibrinierung des Blutes.

In den meisten Untersuchungen über den beta-adrenergen Rezeptor menschlicher Leukocyten und auch in dem von Böyum (22) entwickelten Verfahren zur Auftrennung der Leukocyten aus dem Blut wird Heparin als Antikoagulans verwandt.

Auch wir verwandten zunächst Heparin, doch ließen sich die Bindungsexperimente zur Charakterisierung des lymphocytären Betarezeptors mit den so gewonnenen mononukleären Zellen schlecht reproduzieren. Bei Verwendung von defibriniertem Blut verbesserte sich die Reproduzierbarkeit. Daher defibrinierten wir das Vollblut vor Auftrennung der Blutzellen und verglichen die Zusammensetzung des mononukleären Zellkonzentrates mit der aus heparinisiertem Blut gewonnenen Zellzusammensetzung. (Das Prinzip der Defibrinierung besteht darin, daß man Vollblut zusammen mit Glaskügelchen langsam schwenkt und so eine Gerinnung um die Kügelchen abläuft. In dem sich ausbildenden Fibrinnetz werden überwiegend Thrombocyten angereichert.)

Gesunden Personen wurde am gleichen Tag Blut entnommen und dieses gleichzeitig unter Verwendung von Heparin oder nach

Defibrinierung entsprechend der angegebenen Methodik (s. Teil B, 2. und Abb. 2) präpariert. Die Endvolumina der erhaltenen Zellsuspensionen wurden so eingestellt, daß sich in beiden gleich viele Zellen ($3-10 \times 10^6$ Zellen/ml) befanden. Durch Auszählen in einer Zählkammer wurde die Thrombocytenzahl in diesen Zellsuspensionen ermittelt. Vergleicht man die Thrombocytenzahlen aus beiden Zellproben, so ergibt sich ein um 75% (Mittelwert) geringerer Wert in der aus defibriniertem Blut gewonnenen Zellpräparation. Die Thrombocytenzahl konnte somit von 5-8 Thrombocyten/mononukleäre Zelle auf 1-3 Thrombocyten/mononukleäre Zelle vermindert werden.

Bei der morphologischen Differenzierung zeigte sich weiterhin, daß die aus der Zellsuspension des heparinisierten Blutes hergestellten Präparate sich aufgrund starker Zellaggregationen von Lymphocyten und Monocyten schlechter differenzieren ließen als solche, die aus defibriniertem Blut hergestellt worden waren. Zwischen den Lymphocyten und Monocyten konnte man außerdem angehäuftes Zellmaterial erkennen, bei dem es sich um Thrombocyten handeln könnte. Thrombocyten scheinen demnach nicht nur eine Aggregationsneigung zu besitzen, sondern auch an Lymphocyten und Monocyten zu haften und diese miteinander zu verbinden. Ähnliches wurde von anderen Arbeitsgruppen berichtet (25, 131), die bei Untersuchungen an Monocyten beobachteten, daß Thrombocyten sich besonders an Monocyten anlagern und sowohl deren Oberflächeneigenschaften als auch deren Funktion, wie z.B. ihre Fähigkeit, an Plastik oder Glas zu haften, beeinträchtigen, was auch für Lymphocyten denkbar wäre. Es zeigte sich allerdings, daß durch die Defibrinierung nicht nur Thrombocyten entfernt wurden, sondern auch ein Teil der mononukleären Zellen in dem Fibrinnetz hängen blieb. Um möglichst wenig Zellen durch diesen Vorgang zu verlieren, verdünnten wir das Blut mit gleichem Volumenanteil an Phosphatpuffer, wodurch die Zellausbeute vergrößert werden kann (22). Dies beruht darauf, daß die Tendenz von Erythrocyten und Granulocyten, sich während der

Dichtegradientenzentrifugation zu Aggregaten zu formen und darin Lymphocyten einzuschließen, durch Verdünnung des Blutes vermindert werden kann (22). Außerdem konnte durch dies Verfahren der Thrombocytenanteil nochmals geringgradig gesenkt werden. Allerdings, ein Zellverlust blieb bestehen, so daß die 1,5fache Menge an Blut entnommen werden mußte, um eine gleich konzentrierte Zellsuspension zu erhalten. Für die meisten Bindungsexperimente würden daher statt 40 ml venösen Blutes 60 ml benötigt.

Die methodische Veränderung der Defibrinierung trug entscheidend zur reproduzierbaren Durchführbarkeit der Bindungsexperimente bei (s. auch Teil C, I. 3.2.4.).

Alle in dieser Arbeit angegebenen Ergebnisse wurden an Zellsuspensionen erhoben, die aus defibriniertem Blut hergestellt worden waren.

Hinsichtlich der relativen Verteilung von Lymphocyten, Monocyten und anderen Leukocyten wiesen beide Methoden keinen außerhalb der experimentellen Streubreite liegenden Unterschied auf. Die in jedem Experiment durch morphologische Differenzierung eines nach Pappenheim gefärbten Zellpräparates bestimmte prozentuale Zusammensetzung des mononukleären Zellkonzentrates ergab Werte von (angegeben sind die Mittelwerte):

85% Lymphocyten

12% Monocyten

3% Granulocyten, die sich zumeist aus basophilen (ca. 2%) und einigen segmentkernigen Granulocyten zusammensetzten.

Außerdem befanden sich noch Erythrocyten (ca. 10-20 Erythrocyten/mononukleäre Zelle) im Zellkonzentrat; sie wurden aber nicht routinemäßig mitbestimmt.

Bei der so durchgeführten Isolierungsmethode der mononukleären Zellen entstanden folgende Probleme:

- (1) Da Monocyten und Lymphocyten eine ähnliche Dichte besitzen, sind sie durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Isopaque nicht zu trennen. Ihr relatives

Verhältnis in der Zellsuspension ist also von Individuum zu Individuum entsprechend der relativen Verteilung im Blut sehr unterschiedlich.

- (2) Auch die Zusammensetzung des von einer Person an verschiedenen Tagen präparierten Zellkonzentrates wies während des Untersuchungszeitraums (ca. 334 Tage) Schwankungen auf, die Extremwerte von 67%-97% Lymphocyten in der Zellsuspension erreichten. Abbildung 3 zeigt die relative Anzahl an Lymphocyten einer Person in einem Untersuchungszeitraum von 334 Tagen. Allerdings wurde nur in 15% der Fälle ein Lymphocytenanteil von 80% unterschritten.

Um die Vitalität der Zellen nach Präparation und nach Ende eines Bindungsexperimentes mit 75minütiger Inkubation zu testen, wurde der Trypanblau-Exklusionstest durchgeführt. Direkt nach Präparation erwiesen sich 90% der mononukleären Zellen fähig, kein Trypanblau aufzunehmen, nach über 75 min. Inkubation bei 23°C waren 85% noch vital. Sowohl Präparations- als auch Inkubationsbedingungen (Puffermilieu (140 mM NaCl, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,45), Temperatur 23°C) hatten demnach keinen wesentlichen Einfluß auf die Vitalität der Zellen. Der Trypanblautest ist ein bei Zelluntersuchungen sehr häufig angewandter Vitalitätstest, doch weiß man bis heute nicht genau, auf welchem Mechanismus der Zellen die Fähigkeit beruht, ihr Cytoplasma frei von dieser Farblösung zu halten. Um seine Aussagefähigkeit zu überprüfen, führten wir ihn an lysierten mononukleären Zellen durch. Dazu wurden gemäß der beschriebenen Methode (s. Teil B, 2. und Abb.2) mononukleäre Zellen isoliert und diese in 0,2% NaCl-Lösung oder Aqua bidestl. lysiert. Nach Zugabe von Trypanblau färbten sich 98-99% der Zellen an, woraus wir folgerten, daß der Test geeignet ist, die Vitalität von mononukleären Zellen darzustellen.

Lymphozytenanteil

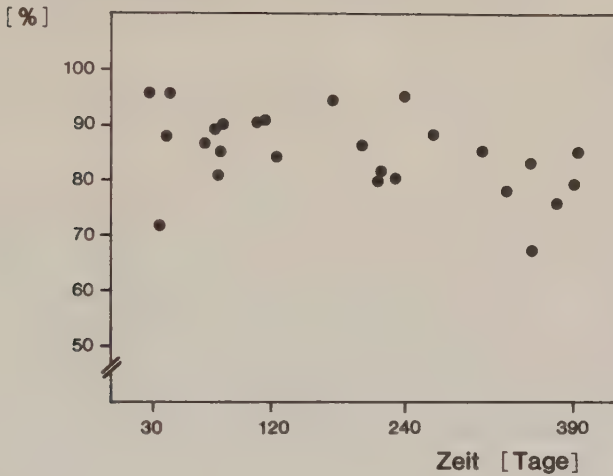


Abb. 3

Prozentualer Anteil an Lymphocyten in der Zellsuspension einer Person während des angegebenen Untersuchungszeitraums

Einer Person wurde während des gesamten Untersuchungszeitraums von 390 Tagen an den angegebenen Tagen Blut entnommen, daraus das mononukleäre Zellkonzentrat isoliert (s. Teil B, 2. und Abb. 2) und diese Zellen morphologisch differenziert (s. Teil B, 3.2.).

Es ergibt sich ein relativer Lymphocytenanteil von 67%-97%.

2. Charakterisierung der spezifischen Bindung von
(+)-¹²⁵I-Cyanopindolol an Betarezeptoren menschlicher
mononukleärer Zellen

2.1. Theoretische Grundlagen zur Quantifizierung spezifischer Rezeptoren mittels radioaktiv markierter Liganden

Durch die Entwicklung radioaktiv markierter adrenerger Liganden ist es möglich geworden, direkt die schon in klassischen pharmakologischen Untersuchungen nachgewiesenen adrenergen Rezeptoren zu qualifizieren und zu quantifizieren. Alle diese Untersuchungen beruhen auf dem grundlegenden Nachweis, daß die einfachste Reaktion zwischen einem Liganden und einem Rezeptor eine durch das Massenwirkungsgesetz beschreibbare bimolekulare Reaktion ist (40, 57).



L = Ligand

R = Rezeptor

LR = Ligand- Rezeptor- Komplex

Die Anzahl der durch den Liganden besetzten Rezeptoren ist also abhängig von der Konzentration an Rezeptor und Ligand sowie von der Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung und das Zerfallen dieses Komplexes. Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, d.h. Hin- und Rückreaktion gehen gleich schnell vor sich, so kann man umformen:

$$\frac{[L] \times [R]}{[LR]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{1}{K}$$

$[L]$ = molare Ligandenkonzentration

$[R]$ = molare Rezeptorkonzentration

$[LR]$ = molare Liganden-Rezeptor-Komplex-Konzentration

- K = Gleichgewichtskonstante
 k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
 k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Bei einer 50%igen Besetzung der Rezeptoren gilt, daß

$$[R] = [LR] \quad (3)$$

Setzt man dies in Gleichung (2) so folgt daraus:

$$[L] = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_D \quad (4)$$

K_D = Dissoziationskonstante

Die Gleichgewichtskonstante, die die freie Ligandenkonzentration angibt, bei der 50% der Rezeptoren besetzt sind, nennt man Dissoziationskonstante. Sie verhält sich umgekehrt proportional zur Affinität eines Liganden zu einem bestimmten Rezeptor. Die Dissoziationskonstante läßt sich auf zweierlei Weisen berechnen:

- (1) anhand des Quotienten aus den Geschwindigkeitskonstanten der Rückreaktion (k_{-1}) und der Hinreaktion (k_{+1}) (57),
- (2) unter Äquilibriumbedingungen z.B. mittels Auftragung nach Scatchard (150).

- (1) Die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1} können durch zeitabhängige Bindungsexperimente bestimmt werden. Dazu wird der radioaktive Ligand in äußerst niedrigen Konzentrationen, die unter seiner Dissoziationskonstanten liegen, eingesetzt.

Bei der Assoziationsreaktion handelt es sich um eine bimolekulare Reaktion, wobei k_{+1} aus der initialen Assoziationsgeschwindigkeit berechnet wird (56).

Die Dissoziationsreaktion startet man dadurch, daß man nach Ausbildung eines Äquilibrium zwischen dem radioaktiv markierten Liganden und dem Rezeptor die Bindung des radioaktiv markierten Liganden durch hohe Mengen

eines unmarkierten Liganden hemmt. Bei halblogarithmischer Auftragung der abnehmenden Menge des spezifisch gebundenen radioaktiv markierten Liganden in Abhängigkeit von der Zeit erhält man eine Reaktionskinetik 1.Ordnung und kann k_{-1} berechnen (57).

- (2) Das Bindungsverhalten von Liganden kann auch im Äquilibrium studiert werden. Prinzipiell gibt es dazu zwei experimentelle Ansätze:

- (a) Man setzt den radioaktiv markierten Liganden in steigenden Konzentrationen zu.
- (b) Eine definierte Menge an radioaktiv markiertem Liganden wird an den Rezeptor gebunden und durch Zugabe steigender Konzentrationen des nicht markierten Analogons aus der Bindung verdrängt. Dabei müssen beide Liganden, der radioaktive und der nicht radioaktive, gleiche Affinitäten zum Rezeptor aufweisen. Nach Trennung des gebundenen vom freien Liganden kann man die Menge an gebundenem Liganden durch Umrechnung über die Menge des noch gebundenen radioaktiven Liganden bestimmen. Zwischen gebundenem und freiem Liganden besteht eine Beziehung, die man durch graphische Auftragung weiter analysieren kann. Der Grundgedanke der graphischen Darstellung besteht darin, eine lineare Beziehung zwischen beiden herzustellen. Würde man die Beziehung zwischen gebundenem (z.B. Ordinate) und freiem Liganden (Abszisse) direkt darstellen, so ergäbe sich eine Sättigungskurve, in der ein Bindungsplateau erreicht würde. Der Schnittpunkt der Asymptote an dieses Plateau ergäbe den Ordinatenwert für die maximale Bindungskapazität. Diesen kann man aber experimentell nicht bestimmen, da man solch hohe Mengen an Liganden einsetzen müßte, daß man zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung nicht mehr unterscheiden könnte. In der Auftragung nach Scatchard (150) und Lineweaver-Burk (106) wird dies durch Extrapolation möglich.

Die Auftragung nach Scatchard läßt sich aus dem Massenwirkungsgesetz herleiten:

Im Äquilibrium der Reaktion nach Gleichung (1) ergibt sich:

$$K_D = \frac{[R] \times [L]}{[RL]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (2)$$

Da die totale Rezeptorkonzentration

$$[R_t] = [R] + [RL] \quad (5)$$

erhält man durch Einsetzen in (2):

$$K_D = \frac{[R_t] - [RL]}{[RL]} \times [L] \quad (6)$$

Durch Umformen erhält man:

$$\frac{[RL]}{[L]} = [R_t] \times \frac{1}{K_D} - \frac{[RL]}{K_D} \quad \text{oder} \quad (7)$$

$$[RL] = [R_t] - K_D \times \frac{[RL]}{[L]} \quad (8)$$

Dies entspricht einer Geradengleichung ($y = -mx + b$). Trägt man $[RL]$ gegen $\frac{[RL]}{[L]}$ auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung $-K_D$. Der Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht der totalen Rezeptorkonzentration $[R_t]$.

Diese graphische Auftragung dient außerdem zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Rezeptormodellen, wie z.B. der positiven Kooperativität, die zu einer nach oben konvexen Kurve im Scatchard-Plot führt und Ausdruck dafür ist, daß durch die Bindung des Liganden die Affinität der noch unbesetzten Bindungsstellen zunimmt. Eine nach oben konkave Kurve kann

sowohl Ausdruck einer negativen Kooperativität als auch der Existenz zweier morphologisch verschiedener Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten zum Liganden sein. Auch dissoziierbare Rezeptoren oder Ligandenbindung in zwei Schritten ergäben solch eine Kurve. Andere Eigenschaften des Rezeptors oder ungewollte Artefakte, die zu einer nicht-linearen Beziehung in der Scatchard-Auftragung führen sind: Polymerisation oder Metabolisierung von Liganden, Trennung von gebundenem und freiem Liganden vor Erreichen des Äquilibrium, unvollständige Trennung dieser beiden oder falsche Definition der unspezifischen Bindung (23, 133).

Eine lineare Darstellung nach Scatchard erhält man bei Vorliegen einer homogenen Rezeptorpopulation ohne kooperative Effekte.

2.2. Untersuchung zur Unterscheidung zwischen unspezifischer und spezifischer Ligandenbindung

Mit den radioaktiv markierten Liganden ^3H -Dihydroalprenolol und ^{125}I -Hydroxybenzylpindolol kann man den Membran-gebundenen an das Adenylatzyklase-System gekoppelten Betarezeptor menschlicher mononukleärer Zellen nachweisen (1, 2, 21, 84, 92, 172). Um die Bindung von $(+)-^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol an mononukleäre Zellen zu charakterisieren, untersuchten wir zunächst die allgemeinen Bindungskriterien, die den spezifischen Betarezeptor als solchen ausweisen:

- 2.2.1. Reversibilität, Kinetik und Affinität der Ligandenbindung
- 2.2.2. Stereoselektivität der spezifischen Ligandenbindung
- 2.2.3. Pharmakologische Spezifität der spezifischen Bindung
- 2.2.4. Sättigbarkeit der spezifischen Bindung

2.2.1. Reversibilität, Kinetik und Affinität der Ligandenbindung

Reversibilität

Zum Nachweis einer vollständigen und rasch reversiblen Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an menschliche mononukleäre Zellen führten wir ein Experiment durch, in dem sich der radioaktiv markierte Ligand an die Zellen band. Nachdem sich ein Äquilibrium der Bindung ausgebildet hatte (ca. nach 60 min.) und alle Bindungsstellen mit (+)- ^{125}J -Cyanopindolol besetzt waren, wurde der radioaktive Ligand mit einer hohen Konzentration (-)-Propranolol ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$) aus seiner Bindung verdrängt. Schon ca. 10 min. nach der Zugabe waren 50% der spezifischen Bindungsstellen nicht mehr vom radioaktiven Liganden besetzt (s. Abb.4)

In dem gesamten Zeitraum (165 min.) blieb die nicht inhibierte Bindung des radioaktiven Liganden konstant; in anderen hier nicht dargestellten Experimenten war bis zu 240 min. ein konstantes Bindungsäquilibrium nachweisbar.

Wir schlossen daraus:

- (1) Die Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an mononukleäre Zellen erfolgt rasch und erreicht nach ca. 60 min. ein Äquilibrium, das über 165-240 min. erhalten bleibt.
- (2) Der unmarkierte Ligand (-)-Propranolol verdrängt (+)- ^{125}J -Cyanopindolol rasch aus seinen Bindungsstellen.

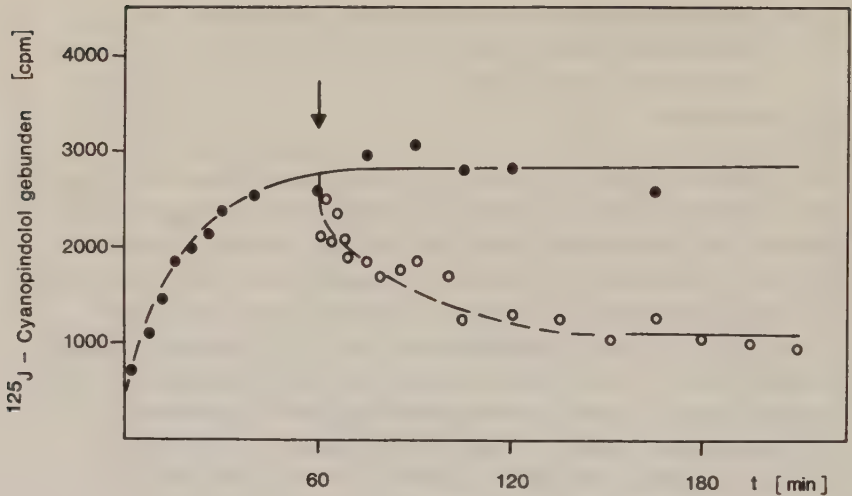


Abb. 4

Zeitabhängige Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an mononukleäre Zellen und zeitabhängige Hemmung der Bindung durch (-)-Propranolol

$1,6 \times 10^5$ mononukleäre Zellen wurden mit 2,86 Femtomolen (+)- ^{125}J -Cyanopindolol, 140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM Glucose, pH 7,45 inkubiert. Nach 60 min. wurde die Bindung des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol mit $2,2 \times 10^{-6}$ M (-)-Propranolol zeitabhängig inhibiert. Die Reaktion wurde durch rasche Filtration gestoppt.

- ——— ● Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol
- ——— ○ Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol nach Zugabe von 2×10^{-6} M (-)-Propranolol

Die Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol erfolgt rasch, erreicht nach 60 min. ein Äquilibrium, das über 165 min. erhalten bleibt. (-)-Propranolol verdrängt den radioaktiv markierten Liganden rasch aus seinen Bindungsstellen.

Kinetik

Assoziationsreaktion

Um die Bildungsgeschwindigkeit des Rezeptor-Liganden-Komplexes zu ermitteln, inkubierten wir $5-9 \times 10^5$ mononukleäre Zellen mit 0,976 Femtomolen (+)- ^{125}J -Cyanopindolol sowie den gleichen Ansatz in Anwesenheit von 10^{-6} M (-)-Propranolol und stoppten die Reaktion in kurzen Zeitabständen durch schnelle Filtration. Nach Subtraktion der unspezifischen Bindung (s. Teil C, I., 2.2.2.) errechneten wir die pro Zeiteinheit gebildete Menge des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol-Rezeptor-Komplexes, wozu folgendes bekannt sein muß:

- (1) Die Anzahl maximal besetzbarer Rezeptoren (diese werden aus einer gleichzeitig durchgeführten konzentrationsabhängigen Bindung im Äquilibrium und Auftragung der Ergebnisse nach Scatchard ermittelt) und
 - (2) die initiale Konzentration an (+)- ^{125}J -Cyanopindolol.
- Diese Daten setzt man in eine Gleichung für eine Reaktion 2.Ordnung ein (56, 57):

$$k_{+1} = \frac{2,303}{(a-b) \times t} \times \log \frac{b(a-c)}{a(b-c)} \quad \text{M}^{-1} \text{min.}^{-1} \quad (9)$$

a = initiale (+)- ^{125}J -Cyanopindolol-Konzentration

b = anfängliche Konzentration an freiem Rezeptor, d.h.
an maximal besetzbarer Rezeptorkonzentration

c = Menge an (+)- ^{125}J -Cyanopindolol-Rezeptor-Komplex
zur Zeit t

Aus der Steigung der sich ergebenden Geraden läßt sich die Assoziationsgeschwindigkeit berechnen.

Diese ergab einen Wert von:

$$k_{+1} = 0,93 \pm 0,07 \times 10^8 \quad \text{M}^{-1} \text{min.}^{-1}$$

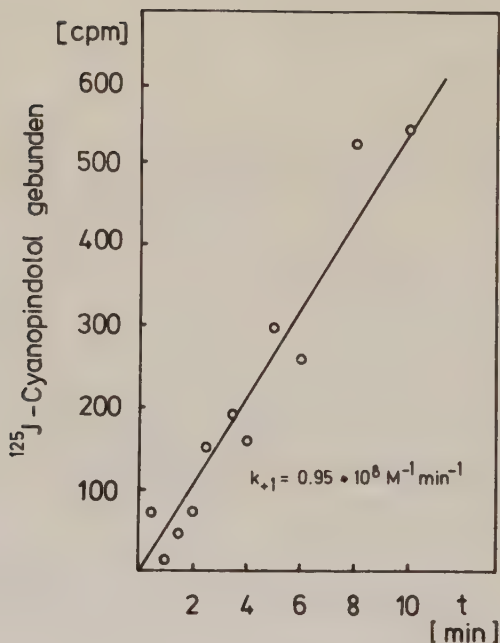


Abb. 5

Assoziationsreaktion von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol an menschliche mononukleäre Zellen

5-9 $\times 10^5$ mononukleäre Zellen wurden mit 0,976 Femtomolen (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol, 140 mM NaCl, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,45 bei 23°C inkubiert. Die Reaktion wurde zu den angegebenen Zeiten durch rasche Filtration gestoppt. Gleichzeitig wurde die unspezifische Bindung in Gegenwart von 10^{-6} M (-)-Propranolol gemessen. Die Bindungsdaten wurden in eine Gleichung (s. Gleichung 9) für Reaktionen 2. Ordnung eingesetzt.

Aus der Steigung der sich ergebenden Geraden ergibt sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von:

$$k_{+1} = 0,93 \pm 0,07 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

Dissoziationsreaktion

Die Dissoziationsreaktion des (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol-Rezeptor-Komplexes wird meßbar, indem man durch hohe Konzentrationen von (-)-Propranolol (10⁻⁶ M) die Bindung des radioaktiven Liganden hemmt. Theoretisch könnte sich das aus seiner spezifischen Bindung verdrängte (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol zwar wieder in einer Assoziationsreaktion an den Rezeptor anlagern, doch durch die hohen Konzentrationen an (-)-Propranolol (10⁻⁶ M) gegenüber dem (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol (2,2 x 10⁻¹¹ M) ist die Wahrscheinlichkeit dieser Reaktion sehr gering, da eine freigewordene Rezeptorstelle sofort mit dem fast 10⁵fach höher konzentrierten (-)-Propranolol besetzt wird. Die zeitabhängig sinkenden Mengen an Rezeptor-gebundenem (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol werden bestimmt und halblogarithmisch aufgetragen. Der Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht dabei der maximalen Besetzung der Rezeptoren mit dem radioaktiven Liganden unter Äquilibriumbedingungen. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante errechnet sich aus:

$$k_{-1} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad \text{min.}^{-1} \quad (10)$$

$t_{1/2}$ = Zeit, nach der noch 50% des radioaktiv markierten Liganden spezifisch gebunden sind

Unter unseren Versuchsbedingungen erhielten wir nicht wie erwartet eine Gerade als Ausdruck einer Reaktion 1.Ordnung, vielmehr ergab sich eine biphasische Kurve, aus der sich zwei Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten errechnen ließen:

$$k_{-1} = 0,91 \pm 0,11 \times 10^{-2} \quad \text{min.}^{-1}$$

$$k_{-2} = 8,07 \pm 0,38 \times 10^{-2} \quad \text{min.}^{-1}$$

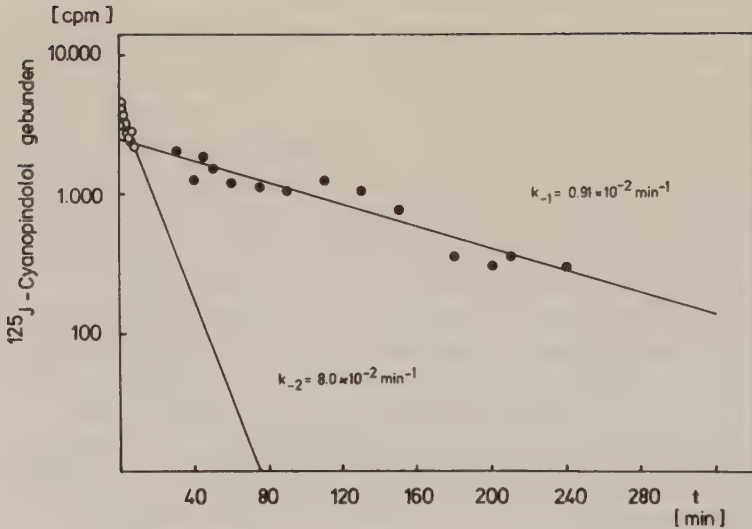


Abb. 6

Dissoziationsreaktion des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol von menschlichen mononukleären Zellen

$7,4 \times 10^5$ mononukleäre Zellen wurden mit 4,4 Femtomolen (+)- ^{125}J -Cyanopindolol, 140 mM NaCl, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,45 in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml bei 23°C 75 min. inkubiert. Danach wurde der (+)- ^{125}J -Cyanopindolol-Rezeptor-Komplex durch Zentrifugation vom überschüssigen freien (+)- ^{125}J -Cyanopindolol getrennt. Das Sediment wurde im Ausgangsvolumen (Puffermilieu wie beschrieben) resuspendiert und die Bindung des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol durch Zugabe von 10^{-6} M (-)-Propranolol gehemmt. Diese Hemmungsreaktion wurde zu den angegebenen Zeiten durch rasche Filtration gestoppt und die noch Zell-gebundene Radioaktivität gemessen. Die unspezifische Bindung wurde subtrahiert und die spezifische Bindung des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol zeitabhängig aufgetragen.

Aus der Neigung der beiden Geraden wurden die Dissoziationskonstanten ermittelt:

● ——— ●	$k_{-1} = 0,91 \times 10^{-2} \text{ min.}^{-1}$
○ ——— ○	$k_{-2} = 8,07 \times 10^{-2} \text{ min.}^{-1}$

Diese biphasische Dissoziationskinetik des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol-Betarezeptor-Komplexes wurde auch von anderen Autoren an der Lunge (54) und dem Herzen (70) des Meerschneinchens, der Rattenniere (28) und der Kaninchenlunge (30) beobachtet. Mehrere Rezeptormodelle könnten diese biphasische Dissoziationskinetik erklären:

- (1) Es existieren unterschiedliche Bindungsstellen mit verschiedenen Affinitäten dem Liganden gegenüber oder eine einzige Bindungsstelle in mehreren Affinitätszuständen.
- (2) Da der radioaktive Ligand ein Racemat ist, könnten seine (-)- und (+)-Isomere zwei Liganden mit differierenden Affinitäten zum Rezeptor darstellen.
- (3) Die Bindung des Liganden könnte eine Konformationsänderung des Rezeptors induzieren, was dann zu einer veränderten Affinität gegenüber dem Liganden führen könnte.

Alle diese Modelle müßten aber theoretisch in der Auftragung nach Scatchard einen von der Linearität abweichenden Kurvenverlauf aufweisen. Wir stellten bei dieser Auftragung aber stets lineare Verläufe fest, so daß mit unseren Daten allein keine Erklärung der biphasischen Dissoziationskinetik möglich ist.

In Untersuchungen der Kinetik von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol und anderen racemischen radioaktiven Liganden zeigte sich allerdings, daß die Abweichung der Linearität im Scatchard-Plot oft nur so gering ist, daß sie unbemerkt bleibt und nur die parallele Untersuchung der reinen Isomere verglichen mit den jeweiligen Racematen zu einer Unterscheidung der möglichen Erklärungsmodelle beitragen kann (70).

Affinität

Gemäß der Beziehung

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad M \quad (4)$$

Kann man aus den kinetischen Bindungsdaten die Dissoziationskonstante berechnen. Sie ist ein Maß (umgekehrte Proportionalität) für die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Es ergaben sich:

$$K_{D1} = 0,98 \times 10^{-10} \quad M$$

$$K_{D2} = 8,68 \times 10^{-10} \quad M$$

Der kinetisch bestimmte Wert der Dissoziationskonstanten stimmt gut mit dem unter Äquilibriumbedingungen erhaltenen Wert ($K_D = 1,98 \times 10^{-10} M$) (s. Teil C, II., 1.) überein. Die geringe Abweichung könnte am ehesten im Rahmen der experimentellen Streuung gesehen werden, sie könnte aber auch durch die langsamer dissoziierende Komponente des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol mitbedingt sein.

Die Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an den Betarezeptor menschlicher mononukleärer Zellen ist demnach eine hochaffine Bindung.

2.2.2. Stereoselektivität der spezifischen Ligandenbindung

Radioaktiv markierte Beta-Agonisten oder -Antagonisten binden sich nicht nur spezifisch an den Rezeptor selbst, sondern auch unspezifisch an andere Membranstrukturen oder auch an Materialien wie Filter, Glas etc. (46, 154). Um die spezifische Bindungsstelle zu charakterisieren, ist es daher zunächst unabdingbar, den Anteil der unspezifischen Bindung zu definieren.

Aus Bindungsversuchen (46) ist bekannt, daß Kriterien wie Geschwindigkeit, Reversibilität und Sättigbarkeit einer Bindung allein nicht ausreichend sind, zwischen dem spezifischen und dem unspezifischen Anteil an der Gesamtbindung von Liganden zu unterscheiden. Lediglich die Stereospezifität, das Unterscheidungsvermögen des Rezeptors zwischen der (-)- und der (+)-Form eines Liganden, erwies sich als ein geeignetes Kriterium zum Nachweis der spezifischen Bindungsstelle (88): (-)-Isomere haben bei gleicher Konzentration eine 10-100fach größere Affinität und physiologische Wirksamkeit als (+)-Isomere (10, 129).

Wir stellten eine Suspension intakter mononukleärer Zellen her, inkubierten diese mit $10 \text{ pM } (+)\text{-}^{125}\text{J-Cyanopindolol}$ und hemmten diese Bindung durch steigende Konzentrationen an (-)- und (+)-Propranolol (10^{-10} bis 10^{-4} M). In Konzentrationen, die kleiner als 10^{-6} M sind, verursacht (-)-Propranolol eine 100fach stärkere Bindungshemmung gegenüber dem radioaktiv markierten Liganden als (+)-Propranolol. In dem Konzentrationsbereich über 10^{-6} M ist die Verdrängungspotenz beider Enantiomere gleich.

Unter der Annahme, daß das stereospezifische Bindungsverhalten der Bindungsstelle ein Kriterium des spezifischen Betarezeptors ist, kann man feststellen, daß in den Konzentrationen $> 10^{-6} \text{ M}$ ein stereospezifisches Unterscheidungsvermögen des Rezeptors nicht mehr möglich ist, es sich also in diesem Bereich um den unspezifischen Teil der Bindung handelt.

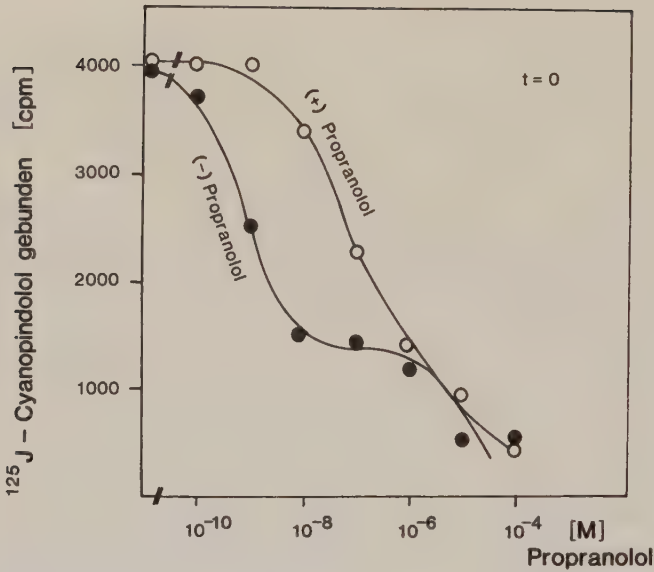


Abb. 7

Stereospezifische Hemmung der Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol durch (-)- und (+)-Propranolol

$2,6 \times 10^5$ mononukleäre Zellen wurden mit 1,49 Femtomolen (+)- ^{125}J -Cyanopindolol, 140 mM NaCl, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,45 und steigenden Konzentrationen (-)- und (+)-Propranolol 75 min. bei 23°C inkubiert und rasch filtriert.

● —● (–)-Propranolol
○ —○ (+)-Propranolol

Die Bindungshemmung von (-)-Propranolol ist in Konzentrationen $\leq 10^{-8}$ M bis zu 100-fach stärker als die von (+)-Propranolol.

Die Zellen wurden in einem weiteren Experiment einer 24-stündigen Inkubation bei 23°C ausgesetzt. Dabei wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol und die Hemmung dieser Bindung durch 10^{-6} M (-)-Propranolol gemessen. Die Bindung des radioaktiven Liganden sank

während der 24 Std. kontinuierlich auf 25% des Ausgangswertes

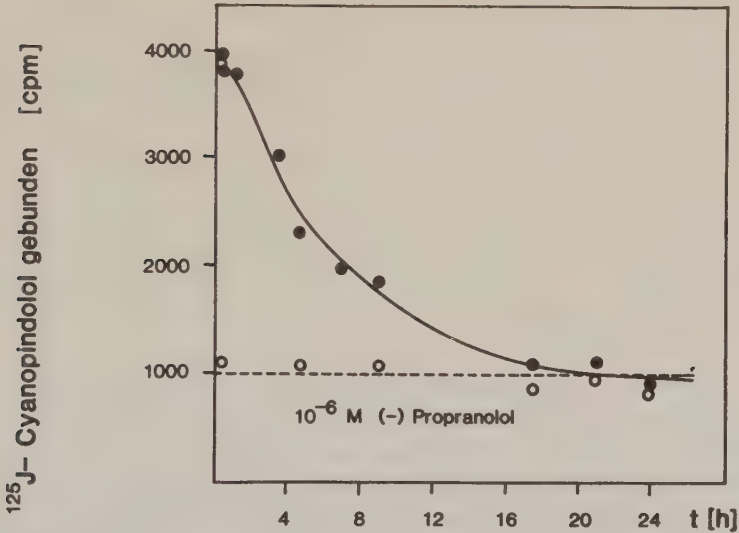


Abb. 8

Maximale und unspezifische Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol an einer bei 23°C inkubierten Suspension mononukleärer Zellen in Abhängigkeit von der Zeit

Die gleiche Zellsuspension wie in Abb.7 wurde bei 23°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol und die Hemmung dieser Bindung durch 10⁻⁶ M (-)-Propranolol gemessen. Dazu wurden 2,6 x 10⁵ Zellen mit 1,49 Femtomolen (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol, 140 mM NaCl, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,45 und im Parallelansatz zusätzlich 10⁻⁶ M (-)-Propranolol 75 min. bei 23°C inkubiert und dann rasch abfiltriert.

- ——— ● maximale Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol
- ——— ○ Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol in Gegenwart von 10⁻⁶ M (-)-Propranolol

Zeitabhängige Abnahme des gebundenen (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol und gleichbleibende Bindung in Anwesenheit von (-)-Propranolol.

ab und erreichte damit die in Anwesenheit von 10^{-6}M (-)-Propranolol gemessene Bindung, die über den gesamten Zeitraum konstant blieb (s. Abb. 8).

An den 24 Stunden lang inkubierten Zellen führten wir ein Verdrängungsexperiment mit (-)- und (+)-Propranolol mit den gleichen Konzentrationen (10^{-10}M bis 10^{-4}M) wie zuvor durch (s. Abb. 7). Die an den Zellen direkt nach der Präparation nachgewiesene Stereospezifität der konzentrationsabhängigen Verdrängung des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol war jedoch nicht mehr nachweisbar. Allerdings war bei Konzentrationen $> 10^{-6}\text{M}$ eine nicht stereospezifische Verdrängung der Bindung zu beobachten, die auch die Zellen direkt nach der Präparation ($t=0$) aufgewiesen hatten (s. Abb. 9).

Durch diese Versuche ist die Abgrenzung der unspezifischen Bindung experimentell begründbar. Die Stereospezifität ist dabei wichtigstes Kriterium zum Nachweis der spezifischen beta-adrenergen Bindungsstelle. Die danach bestimmte unspezifische Bindung entspricht der Bindung an wärmedenaturierten Zellen und beträgt in dem dargestellten Experiment ca. 25% der Gesamtbindung. Wir definierten daher die Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol in Anwesenheit von 10^{-6}M (-)-Propranolol als unspezifische Bindung.

Der Anteil der unspezifischen Bindung lag bei Konzentrationen von 10-250 pM ($\pm$)-Cyanopindolol bei 36%, zwischen 250-500 pM ($\pm$)-Cyanopindolol bei 56%. Landmann (93) fand bei 10 pM ($\pm$)-Cyanopindolol eine unspezifische Bindung von 46% an intakten mononukleären Zellen; bei Verwendung von Membranpräparationen dieser Zellen wird von einem 30-40%igen unspezifischen Bindungsanteil bei Anwesenheit von 10-150 pM ($\pm$)-Cyanopindolol berichtet (29).

Die Problematik einer höheren unspezifischen Bindung, die die Untersuchungen an den aus heparinisiertem Blut isolierten Zellen sehr schwierig gestaltete, wird in Teil C I., 3.2.4. dargestellt.

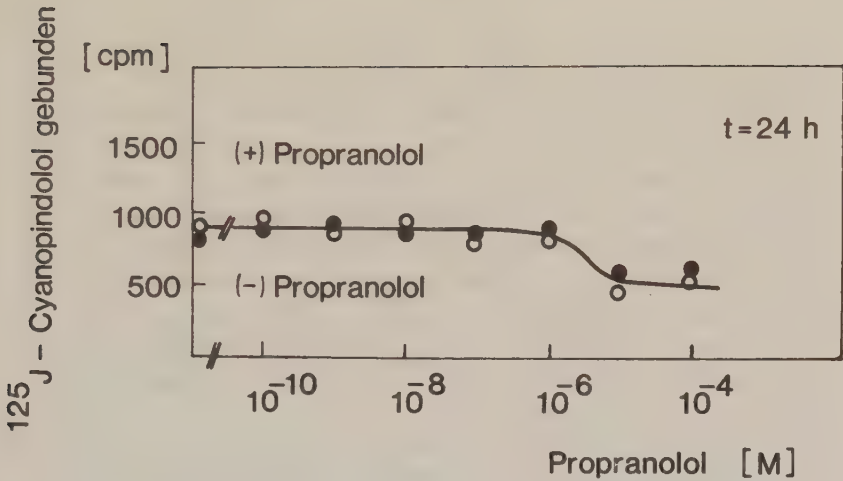


Abb. 9

Untersuchung der Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an wärmedenaturierten mononukleären Zellen hinsichtlich der Stereospezifität

Die auch in Abb. 7 und 8 verwandte Zellsuspension wurde nach 24-stündiger Aufbewahrung bei 23°C mit 1,46 Femtomolen (+)- ^{125}J -Cyanopindolol, 140 mM NaCl, 5mM Glucose 10 mM HEPES, pH 7,45 und steigenden Konzentrationen an (-)- und (+)-Propranolol 75 min. bei 23°C inkubiert und rasch abfiltriert.

● ——— ● (-)-Propranolol
○ ——— ○ (+)-Propranolol

An wärmedenaturierten mononukleären Zellen ist die Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol nicht stereospezifisch.

2.2.3. Pharmakologische Spezifität der spezifischen Bindung

Bei der Charakterisierung adrenerger Rezeptoren hatte man festgestellt, daß hinsichtlich der relativen Wirkstärke Betarezeptor-induzierte Wirkungen stärker durch den Agonisten Isoprenalin als durch Bindung von Adrenalin ausgelöst werden (4). Weiterhin bewies man, daß Isoprenalin an Beta_1 - und Beta_2 - Rezeptoren stärker wirksam ist als Adrenalin oder Noradrenalin (94, 95). Die Wirkstärken der letzteren beiden zeigen am Beta_1 -Rezeptor die Reihenfolge Adrenalin = Noradrenalin, am Beta_2 -Rezeptor hingegen die Rangfolge Adrenalin $\gg$ Noradrenalin.

Wir untersuchten daher, welche Reihenfolge bezüglich der Affinität dieser Agonisten zum adrenergen Rezeptor menschlicher mononukleärer Zellen besteht. Dazu inkubierten wir 1,49 Femtomole (+)- ^{125}J -Cyanopindolol mit steigenden Konzentrationen an (-)-Isoprenalin, (-)-Adrenalin und (-)-Noradrenalin. Gleichzeitig wurde die unspezifische Bindung in Anwesenheit von 10^{-6} M (-)-Propranolol bestimmt. Abbildung 10 zeigt, daß die Substanzen in der Reihenfolge (-)-Isoprenalin $>$ (-)-Adrenalin $\gg$ (-)-Noradrenalin die Bindung des radioaktiven Liganden konzentrationsabhängig hemmen. Zum Vergleich von Agonisten und Antagonisten wurde gleichzeitig auch eine Inhibition der Bindung mit (-)- und (+)-Propranolol durchgeführt. Wir schlossen aus diesem Ergebnis, daß der adrenerge Rezeptor menschlicher mononukleärer Zellen dem eines Beta_2 -Rezeptors entspricht.

Dies Ergebnis steht in Einklang mit allen an menschlichen mononukleären Zellen durchgeführten Bindungsstudien, in denen zum Teil auch durch Verdrängungsexperimente mit einer Reihe beta_1 -oder beta_2 -selektiver bzw. nicht-selektiver Agonisten und Antagonisten nachgewiesen wurde, daß die menschliche mononukleäre Zelle nur den Beta_2 -Rezeptortyp besitzt. Außerdem wurde durch Messung der Adenylatzyklaseaktivität nachgewiesen (84), daß die Beta_2 -Bindungsstelle tatsächlich ein Beta_2 -Rezeptor ist, durch den nach Bindung agonistischer Substanzen ein biologischer Effekt im Sinne einer Aktivitätssteigerung des Enzyms hervorgerufen wird.

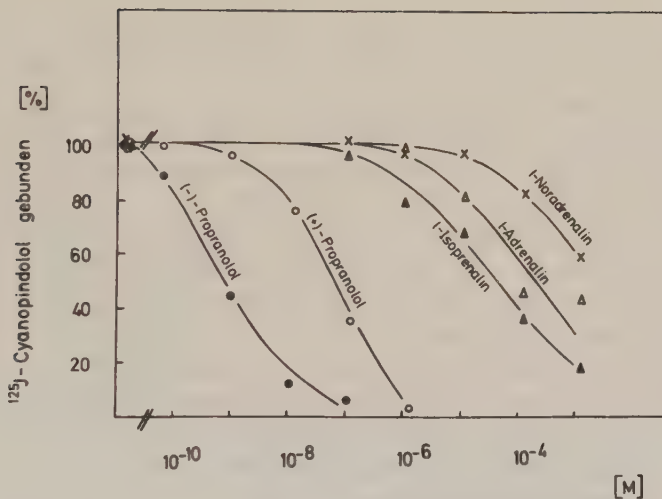


Abb. 10

Hemmung der Bindung von (+)- ^{125}I -Cyanopindolol an menschliche mononukleäre Zellen durch Agonisten und Antagonisten

1,46 Femtomole (+)- ^{125}I -Cyanopindolol wurden mit $1,6 \times 10^5$ mononukleären Zellen und steigenden Konzentrationen (10^{-10} - 10^{-3} M) der genannten unmarkierten Agonisten und Antagonisten in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml (genauen Ansatz s. Teil B, 5.3.) 75 min. bei 23°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil (Definition s. Teil C, I., 2.2.2.) an (+)- ^{125}I -Cyanopindolol ist in Prozent angegeben.

- ——— ● (-)-Propranolol
- O ——— O (+)-Propranolol
- ▲ ——— ▲ (-)-Isoprenalin
- Δ ——— Δ (-)-Adrenalin
- x ——— x (-)-Noradrenalin

Die spezifische Bindung von (+)- ^{125}I -Cyanopindolol wird am stärksten durch die Antagonisten gehemmt. Die Agonisten hemmen in der Rangfolge (-)-Isoprenalin > (-)-Adrenalin $\gg$ (-)-Noradrenalin.

2.2.4. Sättigbarkeit der spezifischen Bindung

Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Durchführung von Bindungsexperimenten an Rezeptoren ist die Sättigbarkeit der spezifischen Bindung. Da die Anzahl spezifischer Rezeptoren auf einer Zelle nur eine endliche Zahl sein kann, muß die spezifische Bindung ebenfalls endlich, d.h. sättigbar sein. Abbildung 11, ein Ausschnitt aus dem der Abbildung 12 zugrunde liegenden Experiment, zeigt die Beziehung von Gesamtbindung, spezifischer und unspezifischer Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol und (+)-Cyanopindolol in Abhängigkeit der zugesetzten Konzentrationen. Der Anteil der spezifischen Bindung nähert sich einer Asymptote und zeigt somit, daß die spezifische Bindung sättigbar ist. Der unspezifische Teil der Bindung hingegen zeigt eine lineare theoretisch unbegrenzte Bindungskapazität.

In den durchgeführten Bindungsexperimenten (s. Teil C, I., 3, II., 1. und 2.) wird demnach eine Bindungsstelle mit endlicher Bindungskapazität bestimmt, die man z.B. durch Auftragung nach Scatchard quantifizieren kann.

3. Quantifizierung der Beta-adrenergen Rezeptoren menschlicher mononukleärer Zellen

3.1. Bestimmung der Rezeptorenzahl einer mononukleären Zelle durch konzentrationsabhängige Bindungshemmung im Äquilibrium

Wir führten mit (+)- ^{125}J -Cyanopindolol und (+)-Cyanopindolol eine konzentrationsabhängige Bindungshemmung im Äquilibrium durch. Mittels Auftragung nach Scatchard konnten so die Dissoziationskonstante K_D und die Anzahl spezifischer Bindungsstellen berechnet werden. Für diese Bindungsversuche wurden $1-10 \times 10^5$ mononukleäre Zellen mit 0,54-1,4 Femtomolen (+)- ^{125}J -Cyanopindolol und steigenden Konzentrationen

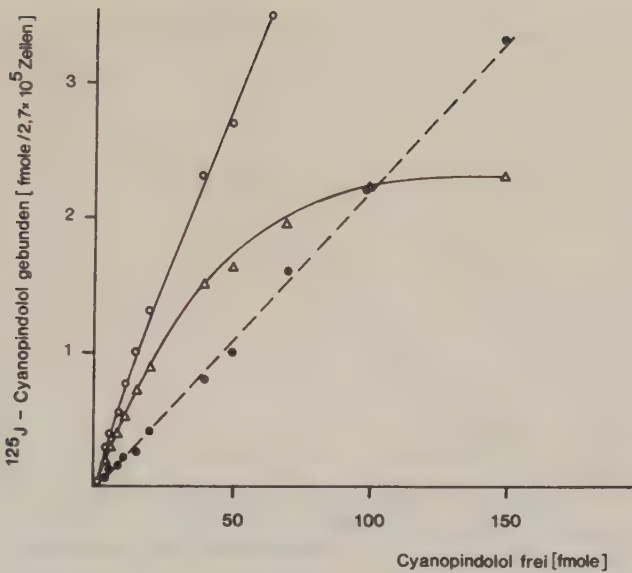


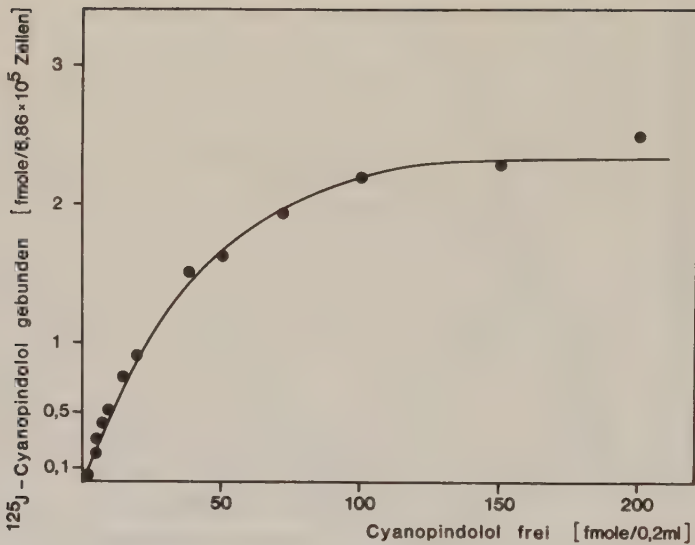
Abb. 11

Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol an menschliche mononukleäre Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration an (+)-Cyanopindolol

2,7 $\times 10^5$ mononukleäre Zellen wurden mit 0,57 Femtomolen (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol und steigenden Konzentrationen an (+)-Cyanopindolol inkubiert. (s. Teil B, 5.3.). Gleichzeitig wurde die unspezifische Bindung in Anwesenheit von 10^{-6} M (-)-Propranolol bestimmt. Durch rasche Filtration wurde die Reaktion beendet.

- ——— ○ Gesamtbindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol
- △ ——— △ spezifische Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol
- ——— ● unspezifische Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol

Gesamtbindung und unspezifische Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol nehmen mit steigenden Konzentrationen linear zu, die spezifische Bindung erreicht eine Sättigung.



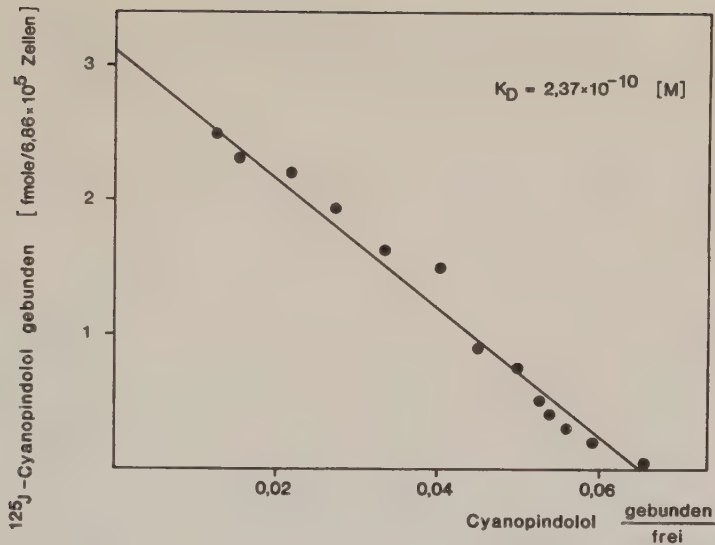
A : Direkte Auftragung

Abb. 12 A

Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol an mononukleäre Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen des unmarkierten Liganden

2,7 × 10⁵ mononukleäre Zellen wurden mit 0,57 Femtomolen (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol und steigenden Konzentrationen unmarkierten (+)-Cyanopindolol sowie in Anwesenheit von 10⁻⁶ M (-)-Propranolol 75 min. bei 23°C inkubiert und rasch abfiltriert. Die Zell-gebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen und die unspezifische Bindung (s. Teil C, 2.2.2.) subtrahiert.

Die spezifische Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol an mononukleäre Zellen erreicht eine Sättigung.



B : Auftragung nach Scatchard

Abb. 12 B

Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an mononukleäre Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen des unmarkierten Liganden

$2,7 \times 10^5$ mononukleäre Zellen wurden mit 0,57 Femtomolen (+)- ^{125}J -Cyanopindolol und steigenden Konzentrationen unmarkierten (+)-Cyanopindolol 75 min. bei 23°C inkubiert und rasch abfiltriert. Die Zell-gebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen. Die unspezifische Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an die mononukleären Zellen wurde in Gegenwart von 10^{-6} M (-)-Propranolol bestimmt und subtrahiert. Die Bindungsdaten der Abb. 12 A sind in Abb. 12 B nach Scatchard aufgetragen.

Aus dem Schnittpunkt mit der Ordinaten läßt sich die maximale Bindungskapazität von $3,11\text{ fmol}/6,86 \times 10^5$ mononukleäre Zellen ablesen. Die Linearität der Beziehung gibt Hinweis auf eine homogene Rezeptorpopulation mit einer Affinität von $K_D = 2,37 \times 10^{-10}\text{ M}$.

(ca. 13-15 Konzentrationsstufen zwischen 10^{-11} und 10^{-8} M) des unmarkierten (+)-Cyanopindolol bei 23°C für 75 min. in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml inkubiert. Gleichzeitig wurde statt des unmarkierten (+)-Cyanopindolol 10^{-6} M (-)-Propranolol zugesetzt und diese Bindung als unspezifischer Teil von der Gesamtbindung, die bei den verschiedenen Konzentrationen an (+)-Cyanopindolol gemessen wurde, subtrahiert. Entsprechend der graphischen Darstellung nach Scatchard wird das spezifisch Gebundene gegen den Quotienten aus Freiem und spezifisch Gebundenem aufgetragen. Aus der Schnittstelle mit der Ordinaten läßt sich die maximale Bindungskapazität und aus der Steigung der Geraden die Dissoziationskonstante ablesen.

Es ergab sich aufgrund der graphischen Darstellung der Bindungsexperimente mit (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an menschliche mononukleäre Zellen eine lineare Beziehung, die auf eine homogene Rezeptorpopulation schließen ließ (s. Abb. 12). Die Rezeptorenzahl pro mononukleäre Zelle wird unter Einbeziehung der Loschmidt'schen Zahl berechnet:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mol} &= 6,02 \times 10^{23} \text{ Moleküle (Loschmidt'sche Zahl)} \\ 1 \text{ fmol} &= 6,02 \times 10^8 \text{ Moleküle} \end{aligned}$$

Der aus der Auftragung nach Scatchard erhaltene Wert für die maximale Bindungskapazität wird mit der Loschmidt'schen Zahl multipliziert und der erhaltene Wert pro Zelle umgerechnet. Daraus ergibt sich die Anzahl spezifischer Bindungsmoleküle pro Zelle, d.h. die Anzahl an Rezeptoren pro Zelle.

Unter Zugrundelegung der Abbildung 13 ergibt sich:

$$\begin{aligned} \frac{3,11 \times 6,02 \times 10^8 \text{ Moleküle}}{6,86 \times 10^5 \text{ Zellen}} &= 2729 \text{ Moleküle/Zelle} \\ &= 2729 \text{ Rezeptoren/Zelle} \end{aligned}$$

Da je nach Zellausbeute die in den Bindungsexperimenten verwandten Zellsuspensionen unterschiedlich viele Zellen enthielten, untersuchten wir, welche Beziehung zwischen der

eingesetzten Zellzahl und der Bindung des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol besteht. Wir bestimmten dazu die spezifische Bindung von 6,9 pM (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an mononukleären Zellen eines Spenders mit unterschiedlicher Zellzahl. (s. Abb. 13).

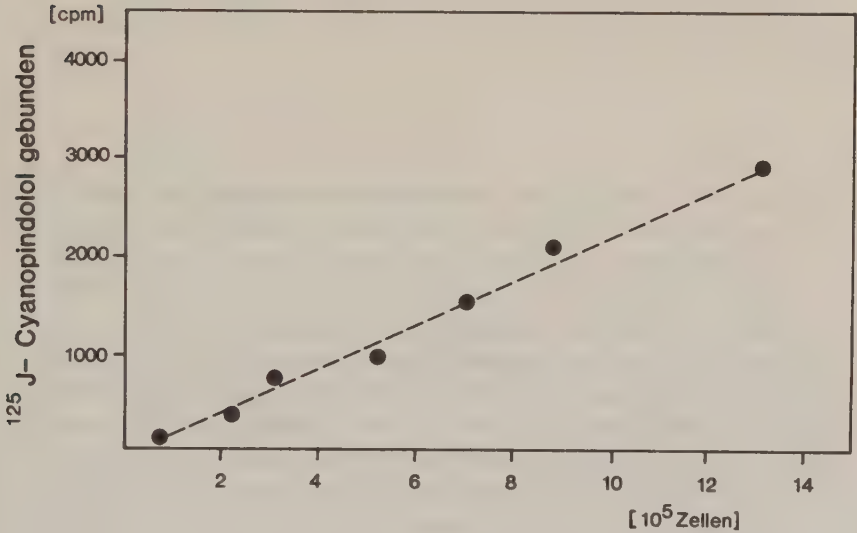


Abb. 13

Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an mononukleäre Zellen in Abhängigkeit von der Zellzahl

$0,68-13,1 \times 10^5$ Zellen wurden mit 1,4 Femtomolen (+)- ^{125}J -Cyanopindolol (genauer Ansatz s. TeilB, 5.3.) 75 min. bei 23°C inkubiert. Gleichzeitig wurde die unspezifische Bindung in Anwesenheit von 10^{-8} M (-)-Propranolol bestimmt. Die Reaktion wurde durch rasche Filtration gestoppt.

Mit zunehmender Zellzahl steigt die spezifische Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol linear an.

Abbildung 13 zeigt, daß zwischen der spezifischen Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol und der Zellzahl im Bereich von $0,6 - 13 \times 10^5$ mononukleäre Zellen/Ansatz eine lineare Beziehung besteht.

Wir folgerten, daß die unterschiedliche Zellzahl (ca. $1-10 \times 10^5$ mononukleäre Zellen/Ansatz) in den durchgeführten Bindungsexperimenten keinen Einfluß auf das Bindungsverhalten hat.

3.2. Einfluß anderer im mononukleären Zellkonzentrat enthaltener Blutzellen auf die Quantifizierung der Betarezeptoren

Bei dieser Art der Berechnung der Betarezeptoren/mononukleäre Zelle muß man sich allerdings fragen, ob es gerechtfertigt ist, die heterologe Zusammensetzung der mononukleären Zellsuspension, die aus 85% Lymphocyten, 12% Monoocyten, 3% Granulocyten (Mittelwerte), Erythrocyten und Thrombocyten bestand, unberücksichtigt zu lassen.

3.2.1. Erythrocyten

Aus der Literatur über Bindungsstudien an mononukleären Zellen ist bekannt, daß die in der mononukleären Zellsuspension ebenfalls vorhandenen Erythrocyten keine spezifische Bindung z.B. von ^3H -Dihydroalprenolol oder ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol aufweisen (114, 172). Ihre Bindung dürfte daher einen Teil der unspezifischen Bindung darstellen. Zwar wird in neueren Untersuchungen von Sager et al. (146) davon berichtet, daß Erythrocyten ein Membran-gebundenes Betarezeptor-Adenylatzyklase-System besitzen, doch die Autoren betonen gleichzeitig, daß unter den für Bindungsstudien an mononukleären Zellen üblichen Versuchsbedingungen keine spezifische Bindung beta-adrenerger radioaktiver Liganden an Erythrocyten nachweisbar ist. Sie

beobachteten, daß die Erythrocyten beim Filtrationsvorgang die Filter fast vollständig passierten, wenn das Ansatzvolumen mit Puffer von Raumtemperatur verdünnt wurde, was unserem Versuchsablauf entsprach.

Wir schlossen daher, daß die in der Zellsuspension enthaltenen Erythrocyten keinen Einfluß auf die spezifische Bindung des (+)- ^{125}I -Cyanopindolol an mononukleäre Zellen haben.

3.2.2. Granulocyten

Granulocyten besitzen eine ähnlich hohe Dichte beta-adrenerger Rezeptoren wie mononukleäre Zellen (114). Bei gleichzeitiger Untersuchung von Granulocyten und mononukleären Zellen stellten Marinetti et al. (114) fest, daß beide Zellarten ähnliche Rezeptordichten aufweisen (bei Bestimmung durch den Liganden ^3H -Dihydroalprenolol: 1330 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle und 1155 Betarezeptoren/Granulocyt), wenngleich es in ihrer Studie auch Personen gibt, bei denen bis zu 45%ige Unterschiede bestehen. Die Granulocyten machen aber nur einen äußerst geringen Anteil (3%) an der Gesamtzellzahl aus, so daß sie, auch wenn sie 50% weniger Betarezeptoren/Zelle besäßen als die mononukleären Zellen, die pro mononukleäre Zelle berechnete Rezeptorenzahl kaum beeinflussen.

Wir gingen daher bei der Berechnung der Rezeptorenzahl davon aus, daß Granulocyten den mononukleären Zellen gleichzusetzen sind.

3.2.3 Monocyten

Dies ist die wichtigste Zellart, die neben den Lymphocyten in relevantem Ausmaß an der Gesamtbindung beteiligt sein könnte, denn ihr relativer Anteil betrug 12% (Mittelwert).

Wir versuchten daher zunächst festzustellen, ob Monocyten überhaupt eine spezifische beta-adrenerge Bindungsstelle

aufweisen. Da es uns nicht möglich war, in qualitativ und quantitativ ausreichender Weise Monocyten zu gewinnen, untersuchten wir die Zellen einer Person mit akuter monocytärer Leukämie. Diese Diagnose war durch ein Myelogramm und cytochemische Differenzierung gesichert. Im peripheren Blut waren 71% Monoblasten vorhanden, in der von uns präparierten Zellsuspension befanden sich 98% Monoblasten. Anhand eines konzentrationsabhängigen Verdrängungsexperimentes mit (-)- und (+)-Propranolol wiesen wir stereoselektives Bindungsverhalten nach. Außerdem war die Bindung sättigbar und in der Auftragung nach Scatchard ergab sich eine Gerade sowie eine Dissoziationskonstante von $2,4 \times 10^{-10}$ M. Die Zahl der Moleküle bzw. Bindungsstellen pro Zelle betrug 6430. Zwar ist bisher an Monocyten noch kein Betarezeptor-Adenylatzyklase-System nachgewiesen worden, doch wir vermuten, daß es möglich ist, daß Monocyten Betarezeptoren besitzen.

Um weiteren Aufschluß über den Einfluß einer hohen Monocytenbeimengung auf die spezifische Bindung zu erhalten, verglichen wir die an den mononukleären Zellen einer Person ermittelten Werte für die Rezeptorenzahl und die Dissoziationskonstante von solchen Bindungsexperimenten, bei denen Zellsuspensionen mit hohen und niedrigen prozentualen Anteilen an Monocyten verwandt worden waren. Die Daten sind in Tabelle 2 dargestellt. Dabei handelt es sich bei den Untersuchungen an den Personen 1-4 um Bindungsstudien, die zeitlich parallel an einem Tag durchgeführt wurden, bei den Untersuchungen an den Personen 5 und 6 um Bindungsexperimente an verschiedenen Tagen.

Die spezifische Bindungskapazität an eine relativ reine Lymphocytensuspension (87%-96%) unterscheidet sich nicht signifikant von der an Zellsuspensionen, die eine 2-19,5fach höhere relative Konzentration an Monocyten enthalten. Dies wird außerdem in Abbildung 14 verdeutlicht, die die Beziehung zwischen der relativen Monocytenzahl der untersuchten Zellsuspension und der berechneten Rezeptordichte/mononukleäre Zelle bei wiederholten Bestimmungen an einer Person wiedergibt.

Personen	Zellsuspension in %			Rezeptoren/ Zelle	K_D [pM]
	Lympho- cyten	Mono- cyten	Granulo- cyten		
1.Person	80	17	3	1897	177
	94	4	2	1989	201
2.Person	81	19	0	3112	200
	90	10	0	3376	243
3.Person	75	23	2	3150	300
	87	10	3	3200	370
4.Person	74	24	2	1747	153
	87	12	1	1687	136
5.Person	58	39	3	2633	272
	67	31	2	3028	177
	83	14	3	2933	277
	96	2	2	2792	440
6.Person	77	20	3	2702	191
	90	8	2	2655	137

Tab.2

Betarezeptorenzahl mononukleärer Zellen und Dissoziationskonstante bei unterschiedlicher prozentualer Zusammensetzung des mononukleären Zellkonzentrates

Besäße der Monocyt z.B. keine spezifischen Rezeptoren, so errechnete man bei hohem Monocytenanteil fälschlich zu wenig Rezeptoren. Es müßte sich dann eine inverse Beziehung zwischen der Rezeptorenzahl/Zelle und dem relativen Anteil an Monocyten ergeben...

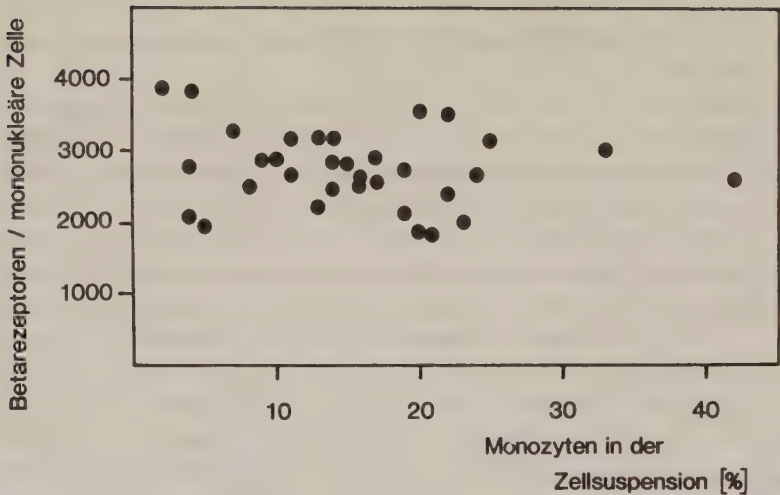


Abb. 14

Abhängigkeit der Betarezeptorenzahl/mononukleäre Zelle von der Monocytenbeimengung in den Zellsuspensionen einer Person

Einer Person wurde an verschiedenen Tagen Blut entnommen, daraus das mononukleäre Zellkonzentrat präpariert und differenziert (s. Teil B, 2, Abb. 2 und 3.). Anschließend wurden Bindungsexperimente im Äquilibrium zur Bestimmung der Betarezeptorenzahl/mononukleäre Zelle durchgeführt (s. Teil B, 5.3. und Teil C, I., 3.)

Die Monocytenbeimengung hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Bestimmung der Betarezeptorenzahl mononukleärer Zellen.

Abbildung 14 zeigt, daß zwischen diesen beiden keine Abhängigkeit besteht.

Wir nahmen daher an, daß Monocyten eine ähnlich hohe Bindungskapazität wie Lymphocyten besitzen. Insgesamt beruht der größte Teil der spezifischen Bindung auf Bindung an Lymphocyten (85%). Auch Williams (172), der als einer der ersten den Betarezeptor menschlicher mononukleärer Zellen charakterisierte, stellte fest, daß Monocyten ähnlich viel ^3H -Dihydroalprenolol spezifisch binden wie Lymphocyten und daß kein signifikanter Unterschied der Bindungskapazität einer 1% oder einer 12% Monocyten enthaltenden Lymphocytenpräparation besteht.

Da wir letztlich nicht genau wissen, in welchem Ausmaß Monocyten zur Gesamtbindung beitragen, bezogen wir bei der Umrechnung der maximalen Bindungskapazität in Rezeptoren/Zelle diese stets auf die gesamte Zellzahl, d.h. auf mononukleäre Zellen.

3.2.4. Thrombocyten

Durch unsere Modifikation der Isolierungsmethode (s. Teil B, 2.) konnte eine Reduktion der Beimengung mit Thrombocyten von ca. 5-8 Thrombocyten/mononukleäre Zelle auf 1-3 Thrombocyten/mononukleäre Zelle erreicht werden. Außerdem wurde gleichzeitig Fibrin aus dem Blut entfernt. Diese methodische Veränderung hatte folgende Auswirkungen auf unsere Bindungsexperimente:

- (1) Bei der morphologischen Differenzierung der Zellausstriche fiel auf, daß die Präparate, die aus heparinisiertem Blut hergestellt worden waren, Zellaggregationen und anderes nicht klar differenzierbares Material enthielten, was in den aus defibriniertem Blut hergestellten Präparaten in weit geringerem Ausmaß beobachtet wurde. Wir vermuteten daher, daß die Thrombocyten zu einer Aggregation mononukleärer Zellen führen. Dies könnte bei der Durchführung eines Bindungsexperimentes zur Folge haben, daß nicht immer gleiche Zellmengen in den Inkubationsansatz einpipettiert wurden. Wie unter Methodik (s. Teil B, 6.) beschrieben, wurden bei den

Bindungsexperimenten jeweils Dreifachwerte bestimmt. Ein derartiger Effekt der Thrombocyten dürfte die Variation der Dreifachwerte eines Inkubationsansatzes verursacht haben. Wir isolierten daher aus dem Blut einer Versuchsperson mononukleäre Zellen durch beide Isolierungsmethoden (s. Teil B, 2. und Abb.2) und führten jeweils ein konzentrationsabhängiges Bindungsexperiment durch. Bei der Auswertung der für jede Konzentration ermittelten Dreifachwerte ergab sich folgendes: bei einer 23%igen Reduktion der Thrombocytenzahl/mononukleäre Zelle (z.B. von 8 auf 6 Thrombocyten/mononukleäre Zelle) sank die Standardabweichung der Dreifachwerte von 13,6% auf 8,8%, bei einer 64%igen Verminderung (z.B. von 9 auf 3 Thrombocyten/mononukleäre Zelle) war die Standardabweichung der Messungen von 17,3% auf 7,4% vermindert. Wir vermuteten, daß die Höhe der Thrombocytenbeimengung Einfluß auf die Streuung der Einzelmessungen hatte. Diese Streuung wirkte sich auch auf die Korrelation der Werte in der Auftragung nach Scatchard aus.

- (2) Bei wiederholten Bindungsexperimenten an mononukleären Zellen einer Person erhielten wir nur sehr schlecht reproduzierbare Ergebnisse, wenn das Blut vor der Präparation heparinisiert worden war. Erst durch Verwendung defibrinierten Blutes gelang es uns, in genauerer Weise die Rezeptorenzahl zu bestimmen. Als Beispiel sind in der Abbildung 15 die in wiederholten Untersuchungen bestimmten Rezeptorenzahlen/mononukleäre Zelle einer Person aus beiden Versuchsreihen (heparinisiertes Blut, defibriniertes Blut) wiedergegeben.

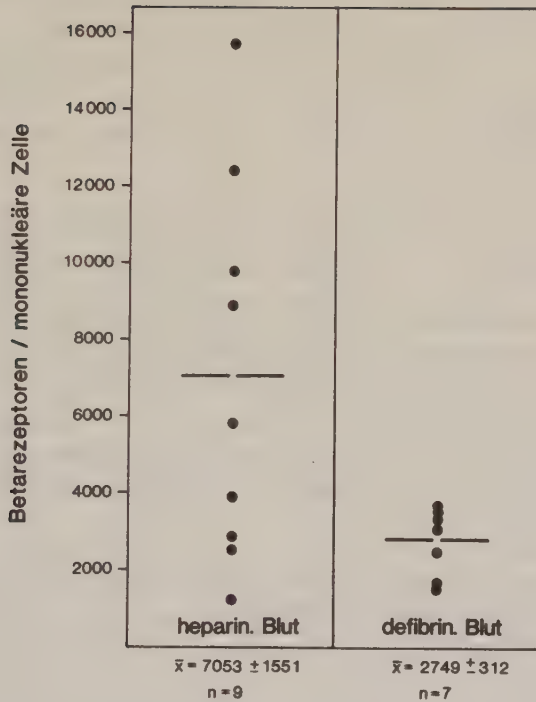


Abb. 15

Betarezeptoren/mononukleäre Zelle einer Versuchsperson bei Verwendung von Zellsuspensionen aus heparinisiertem und defibriniertem Blut

Das venös entnommene Blut einer Person wurde zur Antikoagulation entweder heparinisiert oder defibriniert. Das mononukleäre Zellkonzentrat wurde präpariert und die Betarezeptorenzahl/mononukleäre Zelle durch Bindungsexperimente im Äquilibrium und Auftragung nach Scatchard bestimmt.

Es ergibt sich eine geringere Streubreite bei Verwendung von defibriniertem Blut.

- (3) In beiden Versuchsreihen wurde die unspezifische Bindung als Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol in Anwesenheit von 10^{-6} M (-)-Propranolol bestimmt. (s. Teil C, I., 2.2.2.). Der Anteil der unspezifischen Bindung war in den Experimenten, die mit Zellsuspensionen aus defibriniertem Blut durchgeführt wurden, um 12-24% geringer (s. Tab. 3).

(+)-Cyanopindolol [pM]	Unspezifische Bindung (in.%) an Zellsuspensionen aus	
	defibriniertem Blut	heparinisiertem Blut
10-250	36	60
250-500	56	68

Tab. 3

Anteil der unspezifischen Bindung bei Verwendung unterschiedlicher Zellisolierungsmethoden

Wir vermuteten, daß der höhere Thrombocyten- und Fibrinanteil in der aus heparinisiertem Blut präparierten Zellsuspension zu der höheren unspezifischen Bindung und zu den Meßungenauigkeiten insgesamt beitrugen. Folglich verwandten wir für unsere Bindungsstudien defibriniertes Blut. Es kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden, daß auch ein kleiner Teil der spezifischen Bindung auf Bindung an Thrombocyten beruht. Steer et al. (158) berichten von einer spezifischen Bindung von ^{125}J -Cyanopindolol und ^{125}J -Hydroxypindolol an Thrombocyten, wobei diese aber keine Beta₁-oder Beta₂-Rezeptor-typischen Merkmale aufwies und außerdem sehr gering war (ca. 24 Moleküle/Thrombocyt). Demnach

könnten die Thrombocyten in unseren Versuchen mit höchstens 1-3% an der spezifischen Bindung beteiligt sein. Anderen Autoren (114) gelang es allerdings nicht, an Thrombocyten beta-adrenerge Rezeptoren nachzuweisen. Ihre Existenz ist derzeit noch umstritten.

3.3. Untersuchung der methodischen und der intraindividuellen Variabilität

Um Aussagen über eventuelle physiologisch oder pathophysiologisch bedingte Änderungen der Bindungskapazität oder der Bindungsaffinität menschlicher mononukleärer Zellen machen zu können, bestimmten wir zunächst, in welcher Größenordnung die methodische und intraindividuelle Variabilität dieser Parameter liegt.

Methodische Variabilität

Um die Reproduzierbarkeit der Rezeptorenzahlbestimmung zu überprüfen, wurden aus dem Blut einer Person mononukleäre Zellen isoliert, nach der Präparation zweigeteilt und zeitlich parallel mit $(+)^{-125}\text{J}$ -Cyanopindolol und steigenden Konzentrationen $(+)$ -Cyanopindolol inkubiert. Es bestand somit ein Versuchsablauf, bei dem individuell oder präparatorisch bedingte Einflüsse auf das Versuchsergebnis weitgehend ausgeschaltet wurden. Vom methodischen Ansatz her wäre dies z.B. mit einer mehrmaligen Zellzählung aus einer Blutprobe vergleichbar. Der Variationskoeffizient (= Quotient aus Standardabweichung der Stichproben und Mittelwert der Stichproben) für die Betarezeptorenzahl/mononukleäre Zelle betrug im Durchschnitt 6% (die Standardabweichung des Mittelwertes : $s_{\bar{x}} = \pm 4,28\%$) und für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) 8,1% ($s_{\bar{x}} = \pm 2,02\%$) ($n = 14$).

Für klinisch-chemische Bestimmungsmethoden wie z.B.

Zellzählungen oder Enzymaktivitätsbestimmungen wird ein Variationskoeffizient bis zu 10% toleriert (139). Die biochemische Methode der quantitativen Bestimmung beta-adrenerger Rezeptoren lag damit noch innerhalb der für Routinemethoden im klinisch-chemischen Labor angegebenen Grenzen. Nur in 2 von 14 derartigen Untersuchungen wurde ein Variationskoeffizient von 10% überschritten.

Um noch weiteren Aufschluß über die Meßgenauigkeit unserer Methode zu erhalten, führten wir an einem Tag zwei völlig getrennte Untersuchungen an einer einzigen Person durch. Diese Untersuchung wurde insgesamt 15mal an 5 Männern und 3 Frauen im Alter von 23-62 Jahren durchgeführt. Der Versuchsperson wurden dazu die nötigen Blutvolumina entnommen, diese sofort getrennt, als ob es Blut zweier verschiedener Personen wäre, und die mononukleären Zellen zeitlich parallel isoliert. Auch die Bindungsexperimente wurden zeitlich parallel durchgeführt. Verglichen mit einer Bestimmung im klinischen Labor käme dies z.B. einer Zellzahlbestimmung aus zwei verschiedenen gleichzeitig durchgeführten Blutentnahmen einer Person gleich. Die gemittelten Variationskoeffizienten lagen bei 9,7% ($s_{\bar{x}} = \pm 7,02\%$) bezüglich der Betarezeptorenzahl/mononukleäre Zelle und 7,9% ($s_{\bar{x}} = \pm 1,85\%$) für den Wert der Dissoziationskonstanten.

Wir schlossen daraus, daß man mit der angewandten Methodik in der Lage sein müsse, reproduzierbare Aussagen über Bindungskapazität und Bindungsaffinität des Betarezeptors menschlicher mononukleärer Zellen zu treffen.

Intraindividuelle Variabilität

Des weiteren galt es zu untersuchen, inwieweit die einmalige Bestimmung der Rezeptordichte der mononukleären Zellen einer Versuchsperson tatsächlich die für diese Person repräsentative Rezeptordichte wiedergibt. Wir bestimmten die Rezeptorenzahl/mononukleäre Zelle an 6 Personen (1 Frau und 5 Männer im Alter von 23-68 Jahren), indem wir in einem Zeitraum von 6-11 Monaten zwischen 5 bis 31 Bindungs-

experimente pro Person durchführten (s.Tab. 4). Um etwaige tagesperiodische Einflüsse auszuschließen, fand die Blutentnahme regelmäßig zwischen 8⁰⁰-10⁰⁰ Uhr statt. Bei den Personen, an denen in diesem Zeitraum weniger als 15 Bestimmungen durchgeführt wurden, betrug die Standardabweichung der Mittelwerte der Rezeptorenzahl - abgesehen von einer Ausnahme - mehr als $\pm 10\%$ (s.Tab. 4). Damit ergab sich verglichen mit den als methodische Variabilität bezeichneten Werten von $\pm 4,28\%$ und $\pm 7,02\%$ eine etwas größere Variabilität. Lediglich bei sehr häufiger Bestimmung ($n = 31$) konnte dieser Wert auf $\pm 4\%$ gesenkt werden. Beachtenswert war weiterhin, welche große Spannweite die an einer Person bestimmte Rezeptorenzahl/mononukleäre Zelle aufwies (s.Tab. 4).

Bei keiner Person konnte eine jahreszeitliche Beziehung der Rezeptorenzahl/mononukleäre Zelle festgestellt werden, wie Abbildung 16 exemplarisch zeigt (die Werte wurden an der 6. Person der Tab. 4 erhoben).

Die große Streuung der Versuchsdaten einer Person könnten einerseits methodisch andererseits individuell bedingt sein. Wären die Abweichungen rein methodisch bedingt, so dürften sie sich nur innerhalb der für die methodische Schwankung ermittelten Werte von ca. $\pm 7,02\%$ bewegen. Die Rezeptorenzahl in unserer Untersuchung schwankte aber bis maximal $\pm 17\%$, so daß die größere intraindividuelle Streuung nur zu einem geringeren Teil auf methodisch bedingte Meßungenauigkeiten zurückgeführt werden kann. Andererseits könnte diese Streuung auch Ausdruck einer Reaktion des Organismus auf viele verschiedene Situationen, wie z.B. eine Streß- oder Erholungsreaktion, metabolische Belastung, Infektion etc. sein. So war es bei einigen Personen einfacher, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, als bei anderen Personen. Auch die individuelle Streuung der Rezeptorenzahl (maximale Streuung bei einer Person 3556 Rezeptoren/mononukleäre Zelle, minimale Streuung bei einer anderen Person 1783 Rezeptoren/mononukleäre Zelle) war sehr unterschiedlich.

Personen	Zeit [Monate]	Rezeptorenzahl Minimum -- Maximum	Rezeptoren/ Zelle	Dissoziations- konstante [pM]
1. Person (n = 5)	6	1943 -- 3726	2684 ± 305	269 ± 52
2. Person (n = 8)	9	661 -- 3726	2529 ± 375	230 ± 80
3. Person (n = 9)	9	874 -- 4430	2258 ± 395	178 ± 35
4. Person (n = 12)	10	1327 -- 4135	2775 ± 180	182 ± 23
5. Person (n = 14)	7	1055 -- 4386	2592 ± 283	268 ± 92
6. Person (n = 30)	11	1868 -- 3875	2742 ± 96	269 ± 20

Tab. 4

Betarezeptorenzahl mononukleärer Zellen bei wiederholten Untersuchungen an sechs Personen

In einem Zeitraum von maximal 11 Monaten wurden 6 Personen (5 Männer, 1 Frau (=5. Person)) wiederholt Blut entnommen. Mit dem daraus isolierten (s. Teil B, 2. und Abb. 2) mononukleären Zellkonzentrat wurden Bindungsexperimente im Äquilibrium (s. Teil B, 5.3.) durchgeführt. Die Betarezeptorenzahl/mononukleäre Zelle und die Dissoziationskonstante wurden mittels Auftragung nach Scatchard bestimmt (Mittelwerte ± s_x).

Aus diesen Ergebnissen zogen wir folgende Schlüsse:

Die Zahl der Betarezeptoren pro mononukleäre Zelle ist keine statische sondern eine variable Größe, die eventuell durch bestimmte physiologische (z.B. ergotrophe Phase, trophotrophe Phase, Alter) und hormonale Faktoren (z.B. Katecholamine, Schilddrüsenhormone, Corticoide) oder bestimmte pathophysiologische Situationen (z.B. Hypertonie, Infektionen) beeinflußt und vielleicht in typischer Weise reguliert wird.

Häufigere Bestimmungen an einer Person erlauben, einen Schätzwert dieser Rezeptorenzahl mit hinreichender Genauigkeit anzugeben.

Will man die Auswirkungen bestimmter Einflußfaktoren auf die Rezeptorenzahl untersuchen, so sollte man beim Vergleich von Kollektiven möglichst große Stichprobenumfänge wählen.

II. Klinische Bedeutung der Bestimmung beta-adrenerger Rezeptoren an intakten menschlichen mononukleären Zellen

1. Betarezeptorendichte in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht

Wir bestimmten an 77 sich gesund fühlenden Personen, die keine herz- oder kreislaufwirksamen Pharmaka einnahmen, die Anzahl der Betarezeptoren ihrer mononukleären Zellen sowie die Bindungsaffinität zu $(+)-^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol. Die Personen befanden sich im Alter zwischen 17 bis 86 Jahren, darunter 36 Frauen und 41 Männer, und wurden in zwei Gruppen unterteilt: Personen unter 45 Jahren ($n = 46$, davon 25 Männer, 21 Frauen) wurden als jung bezeichnet, alle Personen über 45 Jahre ($n = 31$, 16 Männer, 15 Frauen) der Gruppe der Alten zugeteilt. Den Versuchspersonen wurde

regelmäßig zwischen 8⁰⁰-10⁰⁰ Uhr ca. 60 ml Blut durch Venenpunktion entnommen und daraus die mononukleären Zellen isoliert. Sofort danach wurden die Bindungsexperimente durchgeführt, die Ergebnisse nach Scatchard aufgetragen und die Zahl der Betarezeptoren/mononukleäre Zelle berechnet. Die in diesen Gruppen gemessenen Rezeptorenzahlen/mononukleäre Zelle und die Dissoziationskonstanten sind in den Tabellen 5 und 6 aufgelistet. Vergleicht man die Rezeptorenzahlen von jungen und älteren Personen, so läßt sich kein signifikanter Unterschied (t-Test nach Student) feststellen, der eine Abhängigkeit vom Alter erkennen ließe (s.Tab.5).

Auch die Dissoziationskonstanten (s.Tab.6) dieser beiden Gruppen differieren lediglich im Bereich der experimentellen Streuung.

Die Affinität und Dichte des Betarezeptors intakter menschlicher mononukleärer Zellen verändert sich demnach mit zunehmendem Alter zwischen 17-86 Jahren nicht (s.auch ... Abb.17).

Auch bei der nach Geschlecht getrennten Analyse der beiden Parameter ergaben sich weder Änderungen, die in irgendeiner Weise mit dem Alter innerhalb einer Geschlechtsgruppe korrelieren noch die auf Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Personen hinweisen. Die Abbildung 17 zeigt zusätzlich die Höhe der individuellen Streuung (bei gleichem Alter zum Teil um den Faktor 3,6). Diese Streuung entspricht der schon bei wiederholten Messungen an einer Person festgestellten Streuungsbreite.

Intra- und interindividuelle Unterschiede sind demnach ungefähr gleich groß und lassen es daher nicht zu, eine bestimmte Rezeptorenzahl für Personen eines Alters anzugeben. Vielmehr können wir nur einen Bereich ermitteln, in dem die Rezeptorenzahl/mononukleäre Zelle einer Altersgruppe anzusiedeln ist und um dessen Mittelwert sie schwankt.

Alter [Jahre]	Betarezeptoren / mononukleäre Zelle		
	Alle n = 77	Männer n = 41	Frauen n = 36
17 - 45 n = 46	2562 $\pm$ 151	2434 $\pm$ 201 n = 25	2715 $\pm$ 223 n = 21
46 - 86 n = 31	2802 $\pm$ 213	2902 $\pm$ 350 n = 16	2694 $\pm$ 228 n = 15
17 - 86 n = 77	2659 $\pm$ 125	2617 $\pm$ 187	2706 $\pm$ 161

Tab. 5

Betarezeptorendichte intakter mononukleärer Zellen von jungen und alten Personen (Mittelwerte $\pm s_{\bar{x}}$)

Alter [Jahre]	Dissoziationskonstante [pM]		
	Alle n = 77	Männer n = 41	Frauen n = 36
17 - 45 n = 46	212 $\pm$ 15	204 $\pm$ 20 n = 25	222 $\pm$ 22 n = 21
46 - 86 n = 31	178 $\pm$ 15	191 $\pm$ 24 n = 16	165 $\pm$ 36 n = 15
17 - 86 n = 77	198 $\pm$ 11	199 $\pm$ 15	198 $\pm$ 15

Tab. 6

Dissoziationskonstante des Betarezeptor-(+)-¹²⁵I-Cyanopindolol-Komplexes intakter mononukleärer Zellen junger und alter Personen (Mittelwerte $\pm s_{\bar{x}}$)

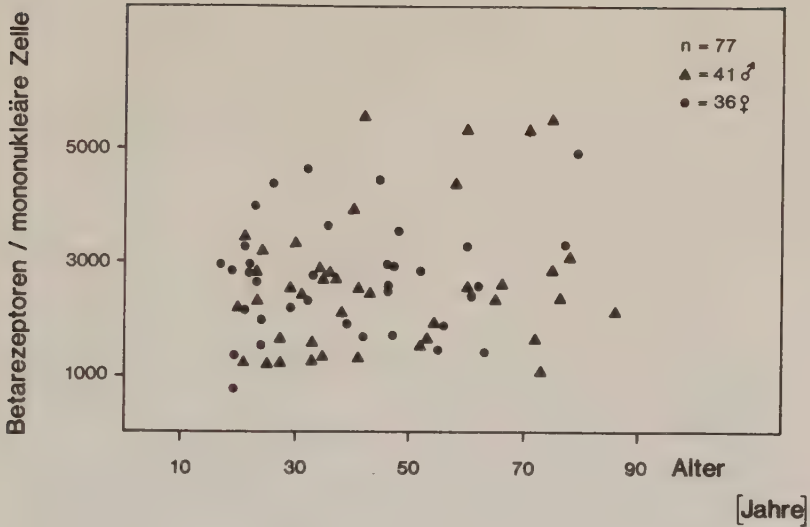


Abb. 18

Zahl der Betarezeptoren mononukleärer Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Personen

77 Personen (41 Männer, 36 Frauen) im Alter von 17 bis 86 Jahren wurden venös 60 ml Blut entnommen und daraus mononukleäre Zellen isoliert (s. Teil B, 2. und Abb. 2). Die Zellsuspensionen wurden mit 0,54-1,74 Femtomolen (+)-¹²⁵I-Cyanopindolol und steigenden Konzentrationen (13-15 Konzentrationsstufen von 10^{-11} bis 10^{-8} M) (+)-Cyanopindolol 75 min. bei 23°C inkubiert (s. Teil B, 5.3.) und rasch abfiltriert. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-6} M (-)-Propranolol bestimmt und subtrahiert. Mittels Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard wurde die Betarezeptorenzahl/mononukleäre Zelle bestimmt.

Das Alter hat keinen Einfluß auf die Zahl der Betarezeptoren mononukleärer Zellen.

Zusammenfassend ergab sich:

Die intakte mononukleäre Zelle des Menschen weist zwischen 779-5502 Betarezeptoren auf mit einer mittleren Rezeptorendichte von 2639 ± 125 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle. Die unter Verwendung des radioaktiv markierten Antagonisten (+)- ^{125}J -Cyanopindolol bestimmte Dissoziationskonstante beträgt 198 ± 11 pM.

Beide Parameter, Rezeptorenzahl und -affinität, zeigen keine Alters- oder Geschlechtskorrelation.

2. Betarezeptorendichte mononukleärer Zellen hyperthyreoter Personen

Um die Auswirkungen einer hyperthyreoten Stoffwechselsituation auf die Betarezeptorendichte mononukleärer Zellen zu beurteilen, untersuchten wir 10 Patienten (7 Frauen, 3 Männer) im Alter von 42-78 Jahren, die einer Radiojodtherapie zugeführt werden sollten. Die Hyperthyreose war klinisch und laborchemisch gesichert. Dabei wurde eine hyperthyreote Stoffwechsellage durch folgende Serumwerte definiert:

Gesamtthyroxin $> 10,9 \mu\text{g/dl}$ (Normalwert: $1,2-2,3 \mu\text{g/dl}$), (Bestimmung mittels eines Thyroxin-EMIT) und/oder freies Trijodthyronin $> 2,3 \text{ ng/ml}$ (Normalwert: $1,2-2,3 \text{ ng/ml}$), (Bestimmung durch ein Trijodthyronin-RIA).

(Die Bestimmung der Schilddrüsenhormonwerte erfolgte freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Vogt, Institut für klinische Chemie, Klinikum Großhadern, München.)

Der basale TSH-Spiegel (Normalwert: $0,8-3,2 \mu\text{U/ml}$) bzw. der TSH-Wert nach TRH-Stimulation (Normalwert: $2,3-21,8 \mu\text{U/ml}$) waren bei 6 Patienten supprimiert. 3 Patienten litten an einem dekompensierten autonomen Adenom, 6 Patienten an einer hyperthyreoten Knotenstruma und 1 Patient an einer Basedow-Struma. Außerdem bestanden bei allen Patienten subjektive und objektive Symptome einer hyperthyreoten

Stoffwechsellage, wie z.B. Ruhetachykardie (Herzfrequenz: $93 \pm 2,6$), große Blutdruckamplitude ($75,5 \pm 5,8$), Atemnot, Abmagerung, Diarrhoe, Durst, Hyperhidrosis, Haarausfall, Tremor und psychische Erregung. Alle sich auf den Schilddrüsenstoffwechsel auswirkenden Medikamente waren mindestens 6 Wochen vor der Untersuchung abgesetzt worden.

Auch diesen Personen wurde zwischen 8⁰⁰-10⁰⁰ Uhr ca. 60 ml Blut venös entnommen und die Bindungsexperimente direkt im Anschluß an die Zellisolierung durchgeführt.

Die Rezeptorenzahl/mononukleäre Zelle betrug zwischen 1610-3992 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle mit einem Mittelwert von 2880 ± 278 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle.

Für die Dissoziationskonstante wurde ein Wert von 153 ± 19 pM ermittelt. Verglichen mit den Werten klinisch euthyreoter Personen des Gesamtkollektivs (2659 ± 125 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle, $K_D = 198 \pm 19$ pM) ergab sich kein signifikanter Unterschied (t-Test nach Student). Da das Alter der hyperthyreoten Patienten - abgesehen von einer Ausnahme (42 Jahre) - über 45 Jahre betrug (Mittelwert: $63,2 \pm 4$ Jahre) verglichen wir die hyperthyreoten Patienten mit der Gruppe der älteren Normalpersonen (s.Abb.18), deren mittlere Rezeptorenzahl/mononukleäre Zelle 2802 ± 213 mit einer $K_D = 178 \pm 15$ pM betrug. Auch hierbei resultierte kein signifikanter Unterschied beider Kollektive.

Des weiteren konnte keine Korrelation zwischen der Rezeptorenzahl und der Höhe der Schilddrüsenhormonwerte beobachtet werden.

Wir konnten daher keinen Einfluß einer hyperthyreoten Stoffwechselsituation auf die Zahl und die Affinität der Beta-rezeptoren intakter menschlicher mononukleärer Zellen ableiten.

Kollektive	Betarezeptoren/ mononukleäre Zelle	Angabe in Prozent	Dissoziations- konstante [pM]
Kontroll- personen n = 31	2802 $\pm$ 213	100	178 $\pm$ 15
Hyperthyreote Personen n = 10	2880 $\pm$ 278	103	153 $\pm$ 19
Änderung	n i c h t s i g n i f i k a n t		

Tab. 7

Zahl und Affinität der Betarezeptoren intakter menschlicher mononukleärer Zellen bei Hyperthyreose

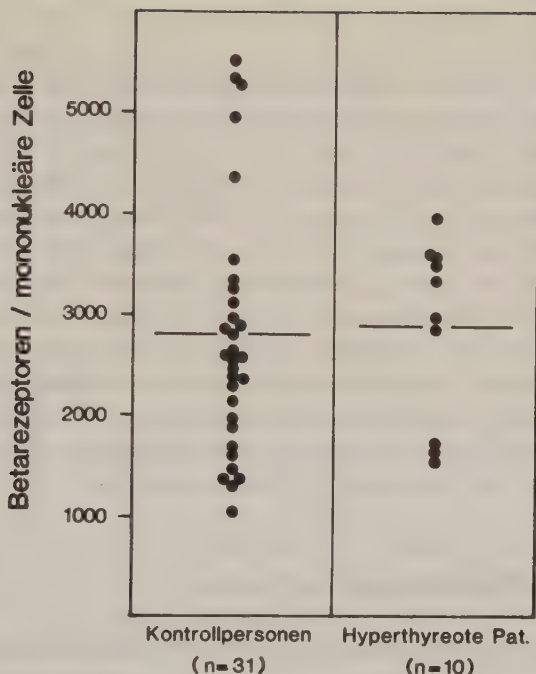


Abb. 18

Betarezeptorenzahl mononukleärer Zellen von hyperthyreoten Patienten

10 hyperthyreoten Patienten (7 Frauen, 3 Männer zwischen 42-78 Jahren) und 31 Personen (15 Frauen, 16 Männer über 45 Jahren) wurden Blut entnommen, daraus mononukleäre Zellen isoliert (s. Teil B, 2. und Abb. 2), diese mit 0,54-1,74 Femtomolen (+)- 125 J-Cyanopindolol und steigenden Konzentrationen (13-15 Konzentrationsstufen von 10^{-11} bis 10^{-8} M) (+)-Cyanopindolol 75 min. bei 23°C inkubiert und rasch filtriert. Die Zell-gebundene Radioaktivität wurde gemessen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-6} M (-)-Propranolol bestimmt und subtrahiert. Aus der Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard wurde die Betarezeptorenzahl/mononukleäre Zelle ermittelt.

Die hyperthyreote Stoffwechsellaage beeinflusst die Betarezeptorenzahl mononukleärer Zellen nicht.

D. DISKUSSION

Nachdem man Anfang des 20. Jahrhunderts erkannt hatte, daß die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin als Hormone und als Neurotransmitter nach Bindung an spezifische Rezeptoren wichtige Funktionen des menschlichen Organismus beeinflussen, gelang es mittels klassischer pharmakologischer Untersuchungen, das Konzept alpha- und beta-adrenerger Rezeptoren zu entwickeln. Besonders die Verwendbarkeit radioaktiv markierter Agonisten und Antagonisten hat dazu beigetragen, diese Rezeptoren näher zu charakterisieren, zu quantifizieren und ihre Regulationsmechanismen zu erforschen. Untersuchungen beta-adrenerger Rezeptoren des Menschen sind vor allen Dingen durch Bindungsstudien an Blutzellen möglich geworden.

I. Diskussion methodischer Probleme

1. Anwendung verschiedener Trennungsmethoden der Blutzellbestandteile

Sowohl menschliche polymorphnukleäre Zellen, in der Literatur vereinfacht Granulocyten genannt, (51, 61, 148) als auch mononukleäre Zellen, das sind überwiegend Lymphocyten (29, 92, 132, 172) weisen Betarezeptoren auf.

Einige Autoren (59) ziehen Granulocyten für Bindungsstudien am Betarezeptor vor, weil es scheint, daß die Präparation dieser Zellen mit z.B. 98% neutrophilen Granulocyten nicht so heterolog zusammengesetzt ist wie die der Lymphocyten. Allerdings stellen Granulocyten eine relativ kurzlebige Leukocytenpopulation dar (Halbwertszeit im Blut: einige Stunden), und sie reagieren z.B. auf Infektionen mit einem hohen Umsatz (Ausschwemmung reifer Granulocyten aus dem Knochenmark). Lymphocyten dagegen haben eine längere Lebenszeit (Halbwertszeit im Blut: für T-Lymphocyten Monate bis

Jahre, für B-Lymphocyten Tage bis Wochen), sodaß sie geeigneter erscheinen, mögliche Veränderungen des Betarezeptorsystems, die auf verschiedensten Faktoren beruhen können, zu reflektieren. Wir führten unsere Untersuchungen daher an Lymphocyten bzw. mononukleären Zellen durch.

Die Isolierung und Differenzierung von Lymphocyten aus dem Blut werfen Probleme auf, die auch vielen anderen Bindungsstudien des beta-adrenergen Rezeptors dieser Zellen innewohnen. Das durch Dichtezentrifugation, dem allgemein üblichen Verfahren, präparierte mononukleäre Zellkonzentrat ist ein heterogenes Gemisch aus T-Lymphocyten, B-Lymphocyten, Null-Lymphocyten und Monocyten. Dabei lassen sich, wie immunologische Untersuchungen zeigen, T- und B-Lymphocyten noch in weitere Subpopulationen wie z.B. T-Helferzellen und T-Suppressorzellen, Killerzellen etc. auftrennen. Die Methoden, mit denen man versucht hat, Monocyten bzw. Makrophagen aus der Zellpräparation zu entfernen (79), haben sich für Bindungsstudien als wenig praktikabel erwiesen, da sie entweder die Monocyten nur unvollständig eliminieren (z.B. bei Zusatz von Eisenpulver) oder die relative Zusammensetzung von B- und T-Lymphocyten noch zusätzlich beeinflussen (z.B. bei Verwendung von Nylonwolle- oder Kunstseide-Säulen). Außerdem ziehen all diese Verfahren (z.B. auch Sephadex-G-10-Säulen oder Baumwoll-Glasperlen-Säulen) über 50%ige Zellverluste nach sich (79), so daß für die Bindungsstudien zur Charakterisierung des Betarezeptors Blutmengen benötigt würden, die bei klinischen Studien nicht mehr vertretbar wären. Die Monocytenbeimengung ist daher in den für klinische Untersuchungen zur Zeit zur Verfügung stehenden Isolierungsmethoden der Lymphocyten kaum vermeidbar. Wir stellten anhand einer lichtmikroskopischen Beurteilung der nach Pappenheim gefärbten Zellpräparate einen Monocytenanteil von 12% (Mittelwert) fest; vereinzelt enthielten unsere Zellpräparate jedoch bis zu 45% Monocyten. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden,

daß es anhand dieser morphologischen Differenzierung schwierig ist, exakt zwischen großen aktivierten Lymphocyten und Monocyten zu differenzieren. Zucker-Franklin (174) wies durch cytochemische Färbemethoden, flow-Cytophotometrie, Phagocytose von Latexpartikeln und elektronenmikroskopische Untersuchungen nach, daß bei der morphologischen Beurteilung mononukleärer Zellen die Konzentration an Monocyten um bis zu 36% zu gering geschätzt wird; diese könnten bis zu 45% des gesamten Zellkonzentrates ausmachen.

Williams (172) konnte allerdings zeigen, daß Monocyten ein ähnliches Bindungsverhalten von ^3H -Dihydroalprenolol aufweisen wie Lymphocyten. Auch durch unsere Untersuchungen ergibt sich, daß der Einfluß einer Monocytenbeimengung nur in geringem Maße die Bestimmung der Betarezeptordichte der Lymphocyten beeinflusst. Da jedoch ein direkter Beweis dieser Vermutung noch aussteht, ist es auch denkbar, daß die Genauigkeit der Bestimmungsmethode durch den Anteil der Monocyten beeinträchtigt wird. Exakterweise muß daher in Bindungsexperimenten die maximale Bindungskapazität auf alle mononukleären Zellen bezogen werden. Da diese sich zu ca. 85% (Mittelwert) aus Lymphocyten zusammensetzten, werden in der Literatur und dementsprechend auch in den folgenden Ausführungen mononukleäre Zellen und Lymphocyten bedeutungsmäßig gleichgesetzt.

In unseren Untersuchungen war außerdem das Vorhandensein von Thrombocyten bedeutungsvoll. Bindungsstudien an Thrombocyten-reicheren Lymphocytensuspensionen erbrachten zwar auch den Nachweis einer sättigbaren, stereospezifischen und hochaffinen Bindung von Betarezeptoren, erwiesen sich aber aus folgenden Gründen für uns nicht als praktikabel:

- (1) Die Einzelmessungen streuten stärker um den Mittelwert.
- (2) Der Anteil der unspezifischen Bindung betrug über 60% und schwankte von Untersuchung zu Untersuchung stark. Nach Reduktion des Thrombocytenanteils sank er auf 35%.

- (3) Die methodische Streuung der Ergebnisse erwies sich als zu hoch.

Man konnte zeigen, daß Thrombocyten ca. 200-300 Alpha₂-Rezeptoren besitzen (123). Die Existenz von Betarezeptoren auf Thrombocyten wurde vermutet (158), bisher aber noch nicht sicher nachgewiesen. Eine geringe spezifische Bindung an eventuell vorhandene beta-adrenerge Rezeptoren auf Thrombocyten kann derzeit nicht ganz ausgeschlossen werden, denn es wird von einer spezifischen Bindung von 24 Molekülen (+)-¹²⁵I-Cyanopindolol/Thrombocyt berichtet (158). Diese dürfte aber bei der in unseren Experimenten vorhandenen Relation von 1-3 Thrombocyten/mononukleäre Zelle nur ca. 1-2% der Gesamtbindung beanspruchen.

2. Definition unspezifischer Bindung von radioaktiv markierten Liganden

Die Messung von Affinität und Anzahl beta-adrenerger Rezeptoren wird dadurch erschwert und zum Teil verfälscht, daß sich die radioaktiv markierten Beta-Antagonisten nicht nur spezifisch an den Rezeptor, sondern auch an unspezifische Strukturen wie z.B. andere Membranproteine, Filter, Glas (46, 154) etc. binden. Dies macht eine möglichst genaue Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung nötig, zumal bis heute keine exakte einheitliche Definition darüber existiert, was die unspezifische Bindung alles beinhaltet. Cuatrecasas (46) konnte z.B. nachweisen, daß die unspezifische Bindung zum Teil Eigenschaften mit der spezifischen Bindung teilt, die letztere eigentlich als solche charakterisieren sollten. Dies sind z.B. Sättigbarkeit, Reversibilität, Spezifität und relativ hohe Affinität ($K_D < 10^{-9}$ M). So z.B. bindet ¹²⁵I-Insulin an Filter, Glas, Talkum und Aluminiumpulver in sättigbarer und spezifischer Weise. ¹²⁵I-Glucagon

bindet sich an Celluloseacetat-Filter und kann lediglich durch Glucagon aus dieser Bindung verdrängt werden, was einer spezifischen Bindung ähnelt (46). Snyder (154) beobachtete sogar eine stereospezifische Bindung von ^3H -Naloxan an Glasfaserfilter, doch konnte in früheren Untersuchungen (168) eine solche stereospezifische Bindung radioaktiv markierter Beta-Blocker an die auch von uns verwandten GF/C-Filter nicht festgestellt werden.

Krawietz et al. (88) belegten experimentell, daß der stereoselektive Bindungsanteil einer Bindung mit der spezifischen Bindung identisch ist. In unseren Untersuchungen an intakten menschlichen Lymphocyten ist die konzentrationsabhängige Hemmung der Bindung von $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol durch $(-)$ -Propranolol bis zu einer Konzentration $< 10^{-6}$ M stereospezifisch. Bei Konzentrationen $> 10^{-6}$ M ist kein stereospezifisches Bindungsverhalten mehr nachweisbar. Mißt man an wärmedenaturierten Lymphocyten den Bindungsanteil von $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol, so stellt man fest, daß dieser genauso hoch ist wie der von 10^{-6} M $(-)$ -Propranolol, wobei sich dessen Bindung während der Denaturierung nur unwesentlich ändert. Im Laufe der Wärmedenaturierung werden demnach spezifische Bindungsstellen zerstört, unspezifische dagegen bleiben in ihrer Bindungskapazität gleich. Es ist daher anzunehmen, daß man das stereospezifische Unterscheidungsvermögen des spezifischen Betarezeptors von Lymphocyten zur Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung einsetzen kann. Die in Gegenwart von 10^{-6} M $(-)$ -Propranolol gemessene Bindung von $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol wurde daher von uns in allen Bindungsexperimenten als nicht Rezeptor-gebunden interpretiert. Allerdings konnte man bei Konzentrationen, die höher als 10^{-6} M $(-)$ -Propranolol waren, eine kompetitive Verdrängung der unspezifischen Bindung beobachten. Dies weist darauf hin, daß man zwar den Anteil der unspezifischen Bindung experimentell bestimmen kann, dieser letztlich aber nicht ganz genau zu ermitteln ist. Der hohe und zum Teil schwankende unspezifische Bindungsanteil in der von uns zunächst durch-

geführten Lymphocytenpräparation aus heparinisiertem Blut erschwerte die Bindungsstudien derart, daß wir statt dessen die Lymphocyten aus defibriniertem Blut präparierten. Es ergab sich dabei ein unspezifischer Bindungsanteil zwischen 36% (bei Konzentrationen von 10-250 pM (+)-Cyanopindolol) und 56% (250-500 pM (+)-Cyanopindolol).

Die Unsicherheit über die Definition des unspezifischen Anteils einer Ligandenbindung spiegelt sich in den von Autor zu Autor wechselnden Definitionen wider.

Bei Bindungsversuchen mit (+)-¹²⁵I-Cyanopindolol bestimmten Hoyer et al. (54, 70) am Meerschweinchenherzen in Gegenwart von 0,25 - 2,5 x 10⁻⁶ M (-)-Propranolol eine unspezifische Bindung von 5-10%, an Rattennierenmembranen betrug diese in Anwesenheit von 10⁻⁶ M (-)-Propranolol 20-25% (28). Hinsichtlich der Untersuchungen an menschlichen Lymphocyten muß man zwischen Bindungsstudien an Lymphocytenmembranen und intakten Zellen unterscheiden.

Bei Verwendung von Membranen variiert der Anteil der unspezifischen Bindung zwischen 1% (92) bis 48% (135), letztere wurde in Anwesenheit von 10⁻⁶ M (-)-Isoproterenol und ¹²⁵I-Hydroxybenzylpindolol unter Zugabe von Phentolamin gemessen. Untersucher, die an miteinander vergleichbaren Lymphocytenmembranpräparationen ³H-Dihydroalprenolol als Liganden benutzen, definieren die in Anwesenheit folgender Konzentrationen verschiedener Liganden gemessene Bindung als unspezifischen Teil (in Klammern sind jeweils die Prozente angegeben):

10⁻³ M (-)-Isoproterenol (30-35%) (21), 10⁻⁶ M (-)-Alprenolol (1-30%) (92), 10⁻⁵ M (+)-Propranolol (10-30%) (172).

Noch schwieriger wird die Unterscheidung dieser beiden Bindungsanteile bei Untersuchungen an intakten Lymphocyten.

Davies (93) berichtet, daß erst durch intensive Zerstörung vorher intakter Lymphocyten der unspezifische Bindungsanteil bei Verwendung von ³H-Dihydroalprenolol von zunächst 60-90% auf 20-30% sank. Bei Versuchen an Rattenretikuloeyten bewirkte die Zerstörung der intakten Zellen eine Reduktion

der unspezifischen Bindung um 90% (76). Bei gleichzeitigen Bindungsstudien von $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol an intakten und lysierten menschlichen Lymphocyten lag der unspezifische Teil in den Untersuchungen an Membranen bei 25%, in den an intakten Zellen bei 46% (93). Die von uns experimentell anhand des stereospezifischen Bindungsverhaltens ermittelte unspezifische Bindung steht in Einklang mit anderen Untersuchungen an intakten Lymphocyten. Unter Verwendung von ^3H -Dihydroalprenolol definierte man 10^{-5} M (2, 114) und 10^{-6} M (84) $(-)$ -Propranolol, bzw. bei Bindung von $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol 5×10^{-7} M $(-)$ -Propranolol (93) als unspezifischen Bindungsanteil, der prozentual in der auch von uns ermittelten Größenordnung lag.

Definition und Höhe der unspezifischen Bindung sind demzufolge vom radioaktiv markierten Liganden und von der untersuchten Zellart abhängig. Dies untersuchte Porzig (136) an schlagenden Rattenherzzellkulturen: Er definierte die Bindung von 10^{-6} M $(-)$ -Timolol als unspezifisch und erhielt unter Verwendung der folgenden radioaktiv markierten Liganden differierende unspezifische Bindungsanteile: $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol 40%, ^3H -Carazolol 21% und ^3H -CgP12177 7%. Des weiteren beobachtete er an Rattenretikuloocyten (195), daß sich durch osmotische Hämolyse der unspezifische Bindungsanteil von 70% auf 10-20% reduzieren ließ. Dieser war außerdem nur bei den intakten Retikuloocyten temperaturabhängig. Auch an intakten kultivierten S 49 Lymphomzellen konnte bei höheren Temperaturen (37°C) eine Zunahme des unspezifischen Bindungsanteils gegenüber niedrigeren Temperaturen (4°C) bemerkt werden (75).

Es ist möglich, daß die hohe unspezifische Bindung und deren Temperaturabhängigkeit bei der Untersuchung intakter Zellen durch eine Aufnahme des radioaktiv markierten Liganden in intrazelluläre Kompartimente bedingt ist. Paietta (128) berichtet von solch einer Aufnahme des Liganden ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol durch menschliche Lymphocyten. Allerdings war die Bindung des ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol nicht sättigbar. Erst nach Entfernung des

intrazellulär befindlichen radioaktiv markierten Liganden wurde Sättigung erreicht. In unseren Bindungsstudien hingegen erwies sich die spezifische Bindung als sättigbar. Marinetti et al. (114) wiesen darauf hin, daß Chloroquin sowohl eine unspezifische intrazelluläre Aufnahme eines radioaktiv markierten Liganden durch Lymphocyten und Granulocyten als auch die Darstellung spezifischer hoch- und niederaffiner beta-adrenerger Bindungsstellen vermindern kann. Um eine eventuelle zelluläre Anreicherung, die auch in unseren Bindungsversuchen vorhanden sein kann, zu reduzieren, führten wir die Bindungsexperimente bei 23°C durch.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß Bindungsexperimente an intakten Zellen stärker durch Faktoren wie Temperatur, Puffermilieu, aktive und passive zelluläre Transportmechanismen beeinflußt werden als solche an Membranpräparationen.

3. Besonderheiten des radioaktiv markierten Liganden

(+)-¹²⁵I-Cyanopindolol

Auch die Wahl des radioaktiv markierten Liganden hat Einfluß auf verschiedene Bindungsbedingungen und Bindungsparameter. Ein prinzipieller Vorteil der mit ¹²⁵I markierten Liganden gegenüber den mit ³H Markierten besteht in ihrer größeren spezifischen Radioaktivität von ca. 2175 Ci/mmol gegenüber 20-60 Ci/mmol. Dadurch wird es möglich, Untersuchungen an geringen Rezeptormengen durchzuführen. Während für Bindungsstudien mit ³H-Dihydroalprenolol an Lymphocyten ca. 100-200 ml Blut benötigt werden, kamen wir unter Verwendung von (+)-¹²⁵I-Cyanopindolol mit 60 ml Blut aus, ein Vorteil, der Bindungsstudien an Patientenkollektiven oder im Verlaufe einer Krankheit klinisch durchführbar macht. Außerdem binden die mit ¹²⁵I markierten Liganden Cyanopin-

dolol und Hydroxybenzylpindolol mit höherer Affinität an den beta-adrenergen Rezeptor ($K_D = 10^{-11} - 10^{-10}$ M) als das mit ^3H markierte Dihydroalprenolol ($K_D = 10^{-9}$ M) (2, 50).

Auch der Anteil der unspezifischen Bindung hängt vom radioaktiv markierten Liganden ab. So ist z.B. die Bindung von ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol häufig mit einer relativ hohen unspezifischen Bindung verbunden, die sich teilweise durch Mitinkubation der Alpha-Blocker Phentolamin oder Phenoxybenzamin und Serotonin vermindern läßt (29).

In unseren Versuchen an intakten menschlichen Lymphocyten ergab sich zwar ein höherer unspezifischer Bindungsanteil (36-56%) als bei Verwendung von Lymphocytenmembranen (30-40%) (29), doch stellte Landmann (93) ebenfalls bei Untersuchung intakter Lymphocyten fest, daß 46% der Bindung des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol unspezifisch waren, bei Gebrauch von ^3H -Dihydroalprenolol sich sogar 55% der Gesamtbindung als unspezifisch erwiesen.

Die Charakteristika des (+)- ^{125}J -Cyanopindolol legen nahe, daß dieser Ligand bei Untersuchungen des beta-adrenergen Rezeptors intakter menschlicher Lymphocyten geeigneter ist als andere radioaktiv markierte Antagonisten.

Allerdings erbrachte die Dissoziationsreaktion einen unerwarteten Befund: Da sich bei der Auftragung nach Scatchard stets Geraden ergaben, die auf das Vorhandensein eines einzigen Rezeptors ohne kooperative Effekte hindeuten, erwartete man auch in der Dissoziationsreaktion bei halblogarithmischer Auftragung eine lineare Beziehung. Wir erhielten aber eine Kurve, aus der man eine biphasische Dissoziationskinetik mit einer schnell und einer langsam dissozzierenden Komponente ableiten kann.

Ähnliche Dissoziationskinetiken sind bei Bindungsstudien an Thyreotropin-Rezeptoren (164) beobachtet worden und auf das Vorhandensein mehrerer ineinander umwandelbarer Affinitätszustände des Liganden-Rezeptor-Komplexes zurückgeführt worden. Neben (+)- ^{125}J -

Cyanopindolol (70) ließen sich auch für $(+)-^3\text{H}$ -Carazolol (34) und $(+)-^{125}\text{J}$ -Hydroxybenzylpindolol (33) biphasische Kinetiken beobachten. Im Gegensatz dazu stellt der Dissoziationsverlauf von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol eine Gerade dar. Die biphasischen Dissoziationskinetiken der radioaktiv markierten Liganden, bei denen es sich um Racemate handelt, könnte man folgendermaßen erklären:

- (1) Existierten unterschiedliche Bindungsstellen mit verschiedenen Affinitäten zum Liganden, so ergäbe sich eine mehrstufige Dissoziationsreaktion. Man könnte demnach z.B. annehmen, daß sich auf der Lymphocytenmembran sowohl Beta_1 - als auch Beta_2 - Rezeptoren befänden. Allerdings bindet $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol an Beta_1 - und Beta_2 - Rezeptoren verschiedener Organe mit gleicher Affinität. Es ist daher unwahrscheinlich, daß es trotz gleicher Affinität zu beiden Rezeptoren mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten von diesen abdissoziiert. Außerdem zeigen Bindungsstudien mit verschiedenen selektiven Beta-Agonisten und Beta-Antagonisten, daß sich auf der menschlichen Lymphocytenmembran lediglich Beta_2 -Rezeptoren befinden.
- (2) Bei dem von uns verwandten $(+)-^{125}\text{J}$ -Cyanopindolol handelt es sich um ein racemisches Gemisch aus $(-)$ - und $(+)$ -Cyanopindolol. Da das $(-)$ -Isomer eines Enantiomerenpaares eine ca. 100fach höhere Affinität zum Betarezeptor besitzt als das $(+)$ -Isomer, könnte es sich bei der Bindung eines Racemates um die Ausbildung zweier Liganden-Rezeptor-Komplexe handeln. Tatsächlich stellte Bürgisser (33, 34), der die Bindung von $(+)-^{125}\text{J}$ -Hydroxybenzylpindolol und $(+)-^3\text{H}$ -Carazolol an Froscherythrocytenmembranen untersuchte fest, daß die reinen $(-)$ - und $(+)$ -Isomere dieser Antagonisten sich mit unterschiedlichen Affinitäten gleichzeitig an den Rezeptor binden. Er folgerte, daß die für die Racemate erhaltenen Werte der Dissoziationskonstanten lediglich Mittelwerte der für die reinen Isomere bestehenden Werte seien,

deren Fehlergröße von der Rezeptorkonzentration bestimmt werde.

- (3) In Untersuchungen an Meerschweinchenventrikeln gleichen sich die Bindungsparameter von (+)- und (-)- ^{125}J -Cyanopindolol, das reine (+)-Isomer hingegen zeigt ein deutlich differentes Bindungsverhalten. Man vermutet daher, daß die (+)-Komponente des ^{125}J -Cyanopindolol bei Verwendung des Racemates vernachlässigbar gering ist. Bei Bindungsstudien im Äquilibrium und anschließender Auftragung nach Scatchard erhielt man für (+)-Cyanopindolol eine gekrümmte Kurve, für (+)- und (-)-Cyanopindolol Kurvenverläufe, die nur geringfügig von der Linearität abweichen (70). Die Autoren (70) stellten die Hypothese auf, daß der Beta-antagonist (+)- ^{125}J -Cyanopindolol einen hoch- und einen niederaffinen Zustand des Rezeptors zu erkennen oder zu induzieren vermag. Dieses beruhe nicht auf der intrinsischen (= agonistischen) Wirkung des Cyanopindolol, da die Zugabe nicht hydrolysierbarer Guaninnukleotide keinen Einfluß auf die Dissoziationskonstante und die maximale Bindungskapazität hatte. Die aus der Bindung von (+)- ^{125}J -Cyanopindolol erhaltene fast lineare Beziehung in der Auftragung nach Scatchard läßt eine Unterscheidung dieser beiden Rezeptorzustände nicht zu. Der daraus ermittelte Wert für die K_D (32,5 pM) lag zwischen den K_D -Werten, die aus den kinetischen Experimenten für die vermutete hochaffine (2,8 pM) und niederaffine (55 pM) Rezeptorform berechnet wurden, wobei ca. 90% der Gesamtbindung der hochaffinen Rezeptorform zugeschrieben wurde. In unseren Versuchen lag, wenn auch nicht so deutlich, der unter Äquilibriumbedingungen ermittelte Wert der Dissoziationskonstanten (198 pM) ebenfalls zwischen den Werten, die sich aus kinetischen Versuchen berechnen ließen ($K_{D1} = 98 \text{ pM}$, $K_{D2} = 867 \text{ pM}$).
- Ross et al. (142), die die biphasische Dissoziationskinetik von (+)- ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol an S 49

Lymphomzellen untersuchten, berichten, daß die langsam dissoziierende Komponente des Liganden-Rezeptor-Komplexes zeitabhängig zunahm. Sie vermuten, daß das radioaktive Racemat zweistufig an den Rezeptor bindet, wobei sich zunächst schnell ein leicht dissoziabler Komplex ausbildet und dann langsamer ein thermodynamisch stabilerer Komplex entsteht. Allerdings ist es nicht möglich, zwischen zwei unterschiedlichen Affinitätszuständen des Rezeptors und zwei ineinander umwandelbaren Rezeptorkonformationen zu unterscheiden.

II. Klinische Anwendbarkeit der Betarezeptorenzahlbestimmung intakter menschlicher Lymphocyten

1. Die Betarezeptorendichte intakter menschlicher Lymphocyten

Bei der Quantifizierung der Betarezeptoren intakter menschlicher Lymphocyten beobachteten wir eine große intra- und interindividuelle Streuung, die wesentlich höher als die methodische Variation (Variationskoeffizient: 7%) war. Anmerkend sei erwähnt, daß einige Autoren die experimentelle Streuung als Variationskoeffizient (VK) angeben, andere als prozentualen Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$). Letzterer läßt sich durch große Stichprobenumfänge minimieren. Zur besseren Vergleichbarkeit sind beide Parameter aufgeführt, wobei der prozentuale Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) in Klammern steht.

In unseren Untersuchungen betrug der intraindividuelle Variationskoeffizient 19-52% ($\pm$ 3,5-17%) und der Interindividuelle ca. 41% ($\pm$ 5,5%). Dieser Problematik bei der Quantifizierung der Betarezeptoren menschlicher Lymphocyten wird erst in neueren Untersuchungen Aufmerksamkeit geschenkt. So berichtet Ginsberg (64), der die Bindung von

³H-Dihydroalprenolol an Lymphocytenmembranen studierte, von folgenden Variationskoeffizienten: 16% für die methodische, 58% für die intraindividuelle und 50% für die interindividuelle Variation. Untersuchungen von Davies (48) und Fraser (58) an Lymphocytenmembranen ergaben unter Verwendung desselben radioaktiv markierten Antagonisten folgende prozentuale Abweichungen: ($\pm$ 5,2%) methodisch (48), ($\pm$ 10,2%) intraindividuell (58) und ($\pm$ 4,8%) interindividuell (VK = 42%) (48) bedingt. Außerdem variierte in der Untersuchung von Davies (48) die Bindung von ³H-Dihydroalprenolol um mehr als 100%, wenn statt der Membranen intakte Zellen untersucht wurden.

Die Untersuchungen an intakten Lymphocyten (72,132) sind ähnlich der unserigen mit einem methodischen Variationskoeffizienten von 5-20% behaftet. Auch die in unseren Experimenten festgestellte intraindividuelle Schwankung von ($\pm$ 3,5-17%) steht in Einklang mit der von Marinetti (114) dargestellten intraindividuellen Abweichung von ($\pm$ 11-13%) bei Untersuchung intakter Lymphocyten.

Diese intra- und interindividuellen Unterschiede könnte man sich folgendermaßen erklären:

- (1) Die untersuchte Zellsuspension besteht aus T-Lymphocyten, B-Lymphocyten und Monocyten, deren relative Zusammensetzung sich nicht nur von Individuum zu Individuum unterscheidet, sondern die sich auch je nach immunologischer Abwehrlage einer bestimmten Person ändern kann. Beständen zwischen diesen Zellpopulationen große Unterschiede hinsichtlich der Rezeptorenzahl/Zelle, so könnte eine Verschiebung der relativen Zusammensetzung der Zellen auch zu fälschlich unterschiedlichen Messungen der Rezeptorenzahl, die auf die gesamte heterogene Zellsuspension bezogen wird, führen. So stellte man (132) an intakten menschlichen Lymphocyten, die aus Tonsillargewebe gewonnen worden waren, fest, daß B-Lymphocyten ca. 600 Betarezeptoren, T-Lymphocyten hingegen nur 200 Betarezeptoren besitzen. Bestimmte man dagegen die Rezeptorenzahl an einer unaufgetrennten

Zellsuspension und der F_2 -Subpopulation der T-Lymphocyten, so ergab sich eine Dichte von 400-600 Betarezeptoren/Zelle. Die F_1 -Subpopulation der T-Zellen wies keine Betarezeptoren auf. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß mittels Nylonwolle isolierte T-Zellen mit einer geringeren cAMP-Produktion auf Isoprenalin reagieren als B- und T-Zell-Gemische, die mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hypaque) gewonnen worden sind. Bei Auftrennung der Lymphocyten aufgrund der Ladung ergab sich allerdings ein gegensätzliches Ergebnis mit einer höheren Betarezeptorendichte auf den T-Zellen (90). Auch variieren die Angaben verschiedener Autoren darüber, welche Lymphocytenpopulation stärker bzw. schwächer durch Isoprenalin stimulierbar ist. Mendelsohn (116) fand, daß B-Lymphocyten des Blutes stärker auf Isoprenalin reagieren als T-Lymphocyten, wohingegen Galant (62) das Gegenteil beobachtete. Bishopric (21) stellte keinen Unterschied in der Zahl der Betarezeptoren oder der durch Isoprenalin stimulierbaren Adenylatzyklaseaktivität zwischen B- und T-Lymphocyten fest, die aus menschlichem Blut stammten. Wenngleich derzeit keine einheitliche Meinung über das Vorhandensein unterschiedlicher Rezeptordichten von B- und T-Lymphocyten besteht, so muß diese Möglichkeit jedoch bei Untersuchungen an Lymphocytenmischungen mit in Betracht gezogen werden. Auch die Monocytenbeimengung könnte zu den Variabilitäten bei der Quantifizierung der Rezeptorendichte beitragen oder diese verfälschen. Wir stellten zwar genau wie Williams (172) fest, daß der schwankende relative Anteil der Monocyten keinen wesentlichen Einfluß auf die Bestimmung der Rezeptorenzahl/mononukleäre Zelle hat, doch könnten uns kleinere Unterschiede, die z.B. bei bestimmten Krankheiten Bedeutung erlangen könnten, verborgen geblieben sein. Es gibt in der Literatur noch keine Untersuchung darüber, wie hoch die Betarezeptorendichte des menschlichen Monocyten ist.

- (2) Verschiedenste physiologische oder pathophysiologische Faktoren, die in Art und Wirksamkeit von Individuum zu Individuum unterschiedlich sind, könnten mit zu der interindividuellen Variabilität der Rezeptordichte beitragen. Dies wäre ein Hinweis darauf, daß Betarezeptoren keine konstante sondern eine regulierbare Größe darstellen.
- (3) Auch könnte es sich einfach nur um biologische Varianten handeln. Abrass und Scarpace (2) berichten, daß die Lymphocyten gesunder Personen zwischen 200-1800 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle aufweisen, es also 9fache Unterschiede zwischen einzelnen Individuen gibt. Auch unsere Untersuchungen an Normalpersonen mit Werten von 779 - 5581 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle weisen auf solche eventuell genetisch bedingte Varianten hin.

Bei Durchsicht der Literatur kann man feststellen, daß die mittlere Rezeptorenzahl/mononukleäre Zelle meist um ca. ± 10 -15% variabel ist. Zwischen den einzelnen Untersuchern bestehen aber noch weitaus größere Schwankungen. Vor allen Dingen die mannigfaltigen Membran- und Zellpräparationsmethoden, die verschiedenen Inkubationsbedingungen und der Gebrauch unterschiedlicher radioaktiv markierter Liganden (^3H -Dihydroalprenolol, (+)- ^{125}J -Cyanopindolol und (+)- ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol) schränken die Vergleichbarkeit zwischen den Arbeitsgruppen erheblich ein, so daß man möglichst nur die Ergebnisse miteinander vergleichen sollte, die größtmögliche Gemeinsamkeiten in der Methodik aufweisen (s. Tab. 8).

Die an intakten Lymphocyten unter Verwendung des Antagonisten ^3H -Dihydroalprenolol gemessenen Rezeptordichten variieren zwischen 775 - 4260 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle. Die von uns dargestellte Rezeptordichte (2659 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle) liegt damit innerhalb der mit ^3H -Dihydroalprenolol ermittelten Werte und ist auch in relativ guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Landmann (93), die an intakten Lymphocyten unter Verwendung

Betarezeptoren menschlicher Lymphocyten in Untersuchungen an Membranen					Zellen	
Autor	fmole/ Protein	Rezeptoren/ Zelle	Autor		Rezeptoren/ Zelle	
<u>³H-Dihydroalprenolol</u>						
Sheppard (153)	682 ± 114		Krall (84)		2200 ± 260	
Brooks (32)	391 ± 40		Hui (72)		1390	
Schocken (152)	150 - 630	8 - 14000	Tashkin (161)		1035 ± 452	
Williams (172)	75 ± 12	2000	Abrass (2)		801 ± 114	
Landmann (92)	60 ± 8	1600				
Landmann (93)	43 ± 1	1113	Landmann (93)		3643	
Ginsberg (64)	25 ± 3	967	Scarpace (149)		775 ± 85	
Tohmeh (162)	25 - 32	810- 1067	Marinetti (114)		4260 ± 642	
			(mit Chloroquin)		1331 ± 100	
<u>¹²⁵I-Cyanopindolol</u>						
Landmann (93)	19 ± 2	555	Landmann (93)		1974	
Brodde (29)		943	Mildeke (117)		420 ± 119	
Brodde (27)	45	100 - 750				
<u>¹²⁵I-Hydroxybenzylpindolol</u>						
Aarons (1)	15		Pochet (132)		500 ± 100	
Marinetti (114)	18		Marinetti (114)		3155 ± 243	
			(mit Chloroquin)		1487 ± 210	

Tab. 8

Literaturauswahl über Untersuchungen an Betarezeptoren menschlicher Lymphocyten

des Liganden (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol 1974 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle nachgewiesen hat.

Noch schwieriger ist die Vergleichbarkeit von Ergebnissen, die an Membranen erhoben wurden, mit solchen, die aus Untersuchungen an intakten Zellen resultieren. Bei vergleichenden Untersuchungen an intakten Lymphocyten und deren Membranpräparationen ließ sich eine um das 3,5fach unterschiedliche Anzahl an Betarezeptoren darstellen (93). Während sich bei Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol an intakte Lymphocyten 1974 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle errechnen ließen, betrugen diese an Lymphocytenmembranen nur 555 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle. Der Wert der Dissoziationskonstanten war in beiden Fällen gleich. Diese Unterschiede zwischen Membranen und intakten Zellen könnten zum einen darauf beruhen, daß durch den Vorgang der Zellzerstörung - sei es durch Ultraschall, sei es durch osmotische Lyse - die Membranproteine in solch kleine Einheiten zerfallen, daß ein Teil der spezifischen Rezeptoren zerstört würden oder diese die Filter paassierten, so daß die Rezeptor-gebundene Radioaktivität fälschlich zu niedrig bestimmt würde.

Untersuchungen von Marinetti et al. (114) deuten auf einen anderen Mechanismus hin, der intakte Lymphocyten von Lymphocytenmembranen unterscheidet. Chloroquin vermag an intakten Zellen, nicht dagegen an ihren Membranpräparationen die errechneten spezifischen Bindungsstellen/mononukleäre Zelle um 50% zu senken. Dieser Effekt des Chloroquin beruht zum einen auf der Hemmung einer unspezifischen intrazellulären Anreicherung des radioaktiv markierten Liganden, einem Vorgang zu dem Membranen allein nicht imstande sind. Zum anderen bewirkt Chloroquin eine Reduktion der niedrigaffinen und zum Teil auch der hochaffinen Bindung des radioaktiv markierten Liganden, so daß sich für die mit Chloroquin behandelten Zellen eine geringere Rezeptordichte ergibt. Man kann allerdings nicht unterscheiden, ob diese Chloroquin-hemmbarren Bindungsstellen Plasmamembran-gebunden sind oder ob sie intrazellulär lokalisiert sind.

Auch die Unterbrechung von Stoffwechselvorgängen könnte Einfluß auf die Rezeptordichte haben. So z.B. ist die Beta-rezeptordichte von Rattenretikuloeyten stoffwechselabhängig (11): Nach Inkubation mit stoffwechsellinhibierenden Substanzen beobachtete man eine 35%ige Reduktion der Rezeptoren/Retikuloeyt, die lediglich die intakten Zellen nicht dagegen die Membranen betraf.

Des weiteren wurde beobachtet, daß Agonisten-induzierte Desensibilisierungsvorgänge einer Zellart durch Untersuchungen der intakten Zellen oder ihrer Membranen unterschiedliche Ergebnisse hervorbringen. Menschliche Astrocytomzellen z.B. verlieren nach Inkubation mit Agonisten 80-90% ihrer Adenylatzyklase-Stimulierbarkeit. Davon sind 30% durch den Verlust an Betarezeptoren bedingt, 50% beruhen auf Vorgängen, die weiter intrazellulär lokalisiert sind. Untersuchungen an Membranpräparationen dieser Zellen spiegeln lediglich den 30%igen Rezeptorverlust wider (80). An Froscherythrocyten trägt eine ATP-abhängige Endocytose während einer Inkubation mit Agonisten zur Verminderung der Rezeptorenzahl bei (38), was an Membranen gar nicht nachgewiesen werden könnte. Außerdem scheint eine enge Beziehung zwischen dem Lipidmetabolismus der Zellmembran und der Betarezeptorenzahl zu bestehen (81).

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

Untersuchungen an intakten Zellen haben den Nachteil schwierigerer experimenteller Durchführbarkeit, was sich z.B. in der höheren unspezifischen Bindung (bis zu 80%) gegenüber Membranpräparationen (meist 10-20%) ausdrückt. Es lassen sich an ihnen aber molekulare Mechanismen der Rezeptorfunktion und Rezeptorregulation darstellen, die durch Aufhebung der zellulären Struktur (z.B. durch Veränderung der Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen, Bruch von H- oder SH-Brücken etc.) verloren gehen. Studien an intakten Zellen können daher den physiologischen Verhältnissen näherkommen und scheinen daher insgesamt aussagekräftiger zu sein.

2. Einfluß des Alters auf die Zahl der Betarezeptoren

Trotz der angeführten experimentellen Schwierigkeiten schien es uns möglich, mittels Bindungsstudien von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol an Beta₂-Rezeptoren intakter menschlicher Lymphocyten zu untersuchen, ob physiologische oder pathologische Zustände Auswirkungen auf ihre Rezeptordichte haben.

Zunächst untersuchten wir, ob eine Beziehung zwischen Alter und Betarezeptorenzahl gesunder Personen besteht. Wir verglichen 46 Personen zwischen 17-45 Jahren (davon 25 Männer, 21 Frauen) mit 31 Personen zwischen 45-86 Jahren (16 Männer, 15 Frauen) und stellten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich Rezeptordichte oder Rezeptoraffinität fest. Dies Ergebnis liefert daher auf Rezeptorebene keine Erklärung für einige Untersuchungen, in denen eine mit zunehmendem Alter verminderte adrenerge Stimulierbarkeit des Menschen festgestellt wurde (165). Es steht sogar im Widerspruch zu der Beobachtung, daß die bei älteren Menschen verringerte kardiovaskuläre Ansprechbarkeit auf Isoprenalin mit einer verminderten Betarezeptordichte der Lymphocyten dieser Personen korreliert ist (59).

Im Blutplasma älterer Menschen konnte man verglichen mit jüngeren Personen erhöhte Spiegel an Adrenalin und Noradrenalin messen (50), was zu der Annahme veranlaßte, daß diese aufgrund ihrer Eigenschaft als Agonisten eine Minderansprechbarkeit adrenerger Rezeptoren auf dem Boden einer verminderten Rezeptordichte induzieren könnten. Tatsächlich bestätigt die Untersuchung von Schocken und Roth (152) diese Vermutung. Sie berichten von einer altersabhängigen Reduktion der Bindungskapazität der Lymphocyten von 570 fmole/mg Protein auf 390 fmole/mg Protein, bzw. einer Reduktion der Rezeptoren von 14000 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle auf 8000 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle. Auch aus den Untersuchungen von Fraser et al. (58) ließe sich der Schluß ziehen, daß die im Alter erhöht gefundenen Katecholamine zu einer Verminderung von Betarezeptoren führen können. Sie behaupten, daß die Betarezeptorenzahl

von Granulocyten und Lymphocyten sich indirekt proportional zur Höhe der Plasmakatecholaminspiegel und ihrer 24 Std.-Urin-Werte verhält. Nach Verabreichung von Propranolol war die Rezeptorenzahl auf beiden Zellarten erhöht, und zwar in einem um so größeren Ausmaß je höher die vor Propranololgabe gemessenen Katecholaminspiegel waren. Die Autoren schlossen daraus, daß endogene Katecholamine normalerweise zu einer Verminderung der Betarezeptoren führen und eine umgekehrte Proportionalität zwischen ihren Plasmawerten und der Zahl der Betarezeptoren besteht (58).

Eine neuere klinische Untersuchung (81) weist darauf hin, daß zwar die kardiale, überwiegend β_1 -induzierte Sensitivität gegenüber Agonisten bei älteren Menschen reduziert ist, sich andere β_2 -gesteuerte Funktionen (z.B. Gefäßmuskeltonus, Glucosekonzentration im Blut etc.) nach Gabe von Agonisten bei älteren Menschen ähnlich verhalten wie bei jüngeren. Diese klinische Beobachtung entspricht unserem Ergebnis auf Rezeptorebene, daß sich außerdem in Einklang mit anderen Untersuchungen an Lymphocytenmembranen (50, 92, 93) und intakten Lymphocyten (2, 27, 75) befindet, in denen ebenfalls keine Korrelation zwischen Alter und Rezeptordichte bzw. Bindungskapazität ermittelt werden konnte. In zweien dieser Studien wurde auch gleichzeitig das Plasma-Noradrenalin gemessen (27, 92): Dieses war bei den untersuchten älteren Personen erhöht, ihre Betarezeptorenzahl der Lymphocyten hingegen war vergleichbar mit der der jüngeren Personen.

Die bisher einzige Untersuchung, in der von einer altersabhängigen Abnahme der Betarezeptorenzahl menschlicher Lymphocyten berichtet wird, teilt Werte von 8000-14000 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle bei einer Dissoziationskonstanten von 20 nM für ^3H -Dihydroalprenolol mit (152). Viele andere Autoren (64, 92, 93, 162, 172), die denselben Liganden verwandten, konstatieren eine Rezeptordichte von 500-2000 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle bei einer Dissoziationskonstanten von 0,1-3 nM. Es ist daher denkbar, daß in den Experimenten von Schocken und Roth (152)

fälschlich zu hohe Rezeptorenzahlen oder eventuell auch nicht beta-adrenerge Rezeptoren mitbestimmt wurden.

Verschiedene Faktoren sind denkbar, die unser Ergebnis einer altersunabhängigen Bindungsaffinität und Bindungskapazität beta-adrenerger Rezeptoren auf menschlichen Lymphocyten beeinflussen oder verfälschen könnten:

- (1) Im alternden menschlichen Organismus ändert sich die relative Zusammensetzung von B- und T-Lymphocyten im Blut bei gleichbleibender absoluter Lymphocytenzahl zugunsten der B-Zellpopulation (111). Wenn B-Lymphocyten wirklich mehr Betarezeptoren/Zelle aufweisen als T-Lymphocyten (132), so könnte die als gleich hoch gemessene Betarezeptorenzahl/mononukleäre Zelle älterer Menschen darauf beruhen, daß in der untersuchten Lymphocyten suspension mehr B-Lymphocyten vorhanden sein könnten. Eine relative Verschiebung von T- zu B-Lymphocyten könnte also eine eventuell vorhandene Änderung der Rezeptordichte verdecken.
- (2) Angenommen es bestehe eine positive Korrelation zwischen Alter und Zahl nicht-funktionell wirksamer Beta-rezeptoren, so könnte dies die klinisch beobachteten Phänomene der verminderten adrenergen Ansprechbarkeit erklären. Unsere Bindungsstudien erfaßten diese Möglichkeit jedoch nicht, da sie nicht zwischen funktionell aktiven und inaktiven Rezeptorformen unterscheiden. Dies untersuchten Krall et al. (83), indem sie die Beziehung zwischen Alter und Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase an Lymphocyten prüften. Sie stellten fest, daß die basale, Isoprenalin-, Guaninnukletid- und NaF-induzierte Aktivität der Adenylatzyklase bei älteren Menschen (65 Jahre) signifikant vermindert ist. Da es auch in vivo und in vitro zu einer Agonisten-induzierten Verminderung der Stimulierbarkeit der lymphocytären Adenylatzyklaseaktivität kommt, könnte man annehmen, daß die im Alter erhöhten Katecholamine über diesen Mechanismus wirken. Der entscheidende Unterschied liegt

aber darin, daß die basale und Guaninnukleotid-stimulierbare Adenylatzyklase in diesen in vitro-Versuchen normal war. Es müßte demnach noch ein anderer Faktor als allein die erhöhten Katecholaminspiegel zu den altersbedingten Veränderungen beitragen. Nach Inkubation der Zellen von jungen und alten Personen stieg die Enzymaktivität wieder an. Man vermutete, daß gewisse Kopplungsfaktoren, die die Stimulation der katalytischen Einheit mitbedingen, auf die Zellen der älteren Personen übertragen worden waren. Es war den Autoren (83, 85) aber nicht möglich, zwischen einer altersbedingten Veränderung der katalytischen, der regulatorischen oder der Kopplung dieser beiden Einheiten zu unterscheiden.

Eine alterskorrelierende oder altersbedingte Abnahme der Ansprechbarkeit des kardiovaskulären Systems des menschlichen Organismus scheint sich nicht in zahlenmäßigen Veränderungen der lymphocytären Betarezeptoren widerzuspiegeln, sondern ist eher in Änderungen zu suchen, die sich auf der Ebene der Adenylatzyklase mit ihren Untereinheiten auswirken.

Auch an menschlichen Granulocyten konnte keine Altersabhängigkeit der Betarezeptorenzahl dargestellt werden (59).

3. Einfluß der hyperthyreoten Stoffwechsellage auf die Zahl der Betarezeptoren intakter menschlicher Lymphocyten

Eine spiegelbildliche klinische Situation bezüglich der Ansprechbarkeit gegenüber Katecholaminen scheint bei der Hyperthyreose gegeben zu sein. Die hyperthyreote Stoffwechsellage geht mit zahlreichen kardialen, metabolischen und zentralnervösen Symptomen einher, die denen einer sympathiko-adrenalen Stimulation ähneln. Diese Symptome können ursächlich aber nicht auf erhöhte Katecholaminspiegel zurückgeführt werden, da diese im hyperthyreoten Zustand relativ unverändert sind (44). Man vermutete daher, daß die hyperthyreote Stoffwechsellage mit einer verstärkten Ansprechbarkeit des Organismus gegenüber Katecholaminen verbunden sein könnte (44).

Die biochemische Grundlage dieser erhöhten Sensibilität könnte in folgenden Mechanismen bestehen: einer veränderten Affinität oder Anzahl von Betarezeptoren, einer strukturellen, zahlenmäßigen oder funktionellen Änderung der katalytischen oder der regulatorischen Einheiten der Adenylatzyklase oder einem alterierten Kopplungsverhalten zwischen Rezeptor und Adenylatzyklase.

Um zu klären, ob eine hyperthyreote Stoffwechsellage sich auf die Anzahl und die Affinität der Beta_2 -Rezeptoren intakter menschlicher Lymphocyten auswirkt, untersuchten wir 10 hyperthyreote Patienten und verglichen diese mit einem altersentsprechenden Kollektiv klinisch euthyreoter Personen. Die Betarezeptorenzahl der hyperthyreoten Patienten (2880 ± 278 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle) unterschied sich nicht signifikant von der der euthyreoten Personen des Kontrollkollektivs (2800 ± 213 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle). Auch bezüglich der Rezeptoraffinitäten dieser beiden Gruppen ($K_D = 153 \pm 18$ pM bei den hyperthyreoten und $K_D = 178 \pm 15$ pM bei den klinisch euthyreoten Personen) war kein Unterschied ableitbar.

Unser Ergebnis entspricht der Untersuchung von Williams (170), der an Lymphocytenmembranen ähnliche Werte für die Zahl und Affinität der Betarezeptoren hyperthyreoter und normaler Personen erhielt. Auch die durch Isoprenalin ausgelöste Anreicherung von cAMP war in beiden Kollektiven gleich hoch. Ginsberg (64) untersuchte die lymphocytären Betarezeptoren von Personen, denen in einer Doppelblindstudie eine Woche lang Trijodthyronin verabreicht worden war. Er konnte eine Zunahme der Rezeptorenzahl von 967 ± 136 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle auf 2250 ± 387 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle registrieren. Die Affinität gegenüber dem verwandten ^3H -Dihydroalprenolol änderte sich aber in seiner Untersuchung nicht ($K_D = 1,1 \text{ nM}$).

Will man die von uns und Williams (170) durchgeführten Studien mit der von Ginsberg (64) vergleichen, so muß man bedenken, daß sich ein experimentell schnell erzeugter hyperthyreoter Zustand vorher euthyreoter Personen (subjektive Symptome wurden während des hyperthyreoten Zustands nicht bemerkt) grundsätzlich von dem einer chronisch vorhandenen spontanen klinisch manifesten Hyperthyreose unterscheidet. Dies könnte auch Auswirkungen auf eine eventuelle Regulation der Betarezeptoren haben. Andersson (8) bestimmte die Zahl der Betarezeptoren und die Aktivität der Adenylatzyklase an Leukocyten 10 hyperthyreoter Patienten während hyperthyreoter Stoffwechsellage und nach Therapie im euthyreoten Zustand. Die Bindungskapazität der Leukocyten im hyperthyreoten Zustand ($198 \pm 46 \text{ fmole/mg Protein}$) war verglichen mit der unter euthyreoter Stoffwechsellage ($124 \pm 36 \text{ fmole/mg Protein}$) erhöht. Die Isoprenalin-induzierte Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase verhielt sich ähnlich. Ein wesentlicher Unterschied gegenüber unserer Untersuchung besteht im Vergleichskollektiv: in den letzten beiden Studien (8, 64) stellte eine Person - sei es, daß sie zunächst hyperthyreot war und dann euthyreot wurde, sei es, daß sie experimentell Trijodthyronin-hyperthyreot gemacht wurde - die eigene Kontrolle dar; in unserer und der von Williams (170) durchgeführten Untersuchungen hin-

gegen werden zwei heterologe Kollektive euthyreoter und spontan hyperthyreoter Personen einander gegenübergestellt. Es ist durchaus denkbar, daß die bestehenden interindividuellen Variabilitäten der Rezeptorenzahl, die sich in beiden Gruppen finden lassen (Euthyreote wiesen Werte von 1100-5500 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle, Hyperthyreote von 1950-4000 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle auf), einen eventuell doch vorhandenen Unterschied zwischen eu- und hyperthyreotem Zustand verdecken.

Aber auch die Untersuchungen am Tiermodell sind widersprüchlich. So werden z.B. am Rattenherzen sowohl eine Zunahme von Betarezeptoren ohne erhöhte Isoprenalin-induzierte Adenylatzyklaseaktivität (171) als auch eine erhöhte Aktivierbarkeit der Enzymaktivität ohne Änderung der Rezeptorenzahl (20) beschrieben; es konnten auch beide Mechanismen gleichzeitig festgestellt werden (8). An Rattenfettzellen beobachtete Malbon (112), daß die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase direkt vom Schilddrüsenhormonstatus abhängig ist aber ohne eine Änderung der Rezeptordichte einhergeht. Cicaraldi und Marinetti (39) degegen berichten, daß diese Zellen im hyperthyreoten Organismus eine 200%ige Zunahme ihrer Betarezeptoren aufweisen. Eine solche Zunahme wäre dadurch erklärbar, daß Schilddrüsenhormone eine Neusynthese von Rezeptor- oder Enzymmolekülen auslösen könnten, was ihrem eigentlichen Wirkungsmechanismus auf Zellen entspräche. An Herzmuskelgewebe (91) jedoch findet trotz chemischer Blockade der Proteinsynthese mit Cycloheximid eine sehr rasche durch Schilddrüsenhormone in Gang gesetzte Zunahme von Betarezeptoren statt. Es könnte daher sein, daß schon präformierte intrazellulär befindliche Rezeptormoleküle in die Zellmembran eingebaut werden, doch scheint dieser Mechanismus nur die rasche zelluläre Antwort auf die Einwirkung von Schilddrüsenhormonen darzustellen (91).

Einige Autoren (20), die über eine erhöhte Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase ohne begleitende Änderung der

Adenylatzyklase berichten, nehmen an, daß Schilddrüsenhormone Einfluß auf den Kopplungsmechanismus zwischen Betarezeptor und Adenylatzyklase haben. Weitere Erklärungsmodelle sind eine Alteration der Membranfluidität, eventuell mittels der hochaffinen Plasmamembran-gebundenen Trijodthyroninrezeptoren, oder die Zunahme von Beta- auf Kosten von Alpha-Rezeptoren (91).

Es wird verständlich, daß die eventuell durch Schilddrüsenhormone modifizierte Ansprechbarkeit von Organismen auf mehrere molekulare Veränderungen des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems zurückgeführt werden kann. Diese könnten aber nicht nur speziesspezifisch sondern auch zellspezifisch sein. Um dieses Problem zu klären, führten Scarpace und Abrass (148) Bindungsstudien an Herz-, Lungen- und Lymphocytenmembranen eu- und hyperthyreoter Ratten durch. Die myokardialen Betarezeptoren hyperthyreoter Tiere waren um 60% gegenüber den euthyreoten Kontrollen erhöht. Lunge und Lymphocyten zeigten aber keine Rezeptorenzahldifferenzen. Außerdem war die Aktivierbarkeit der Adenylatzyklase der Lymphocyten nicht verändert, wohingegen diese sich im Lungengewebe als erhöht nachweisen ließ. Demnach kann der Einfluß von Schilddrüsenhormonen je nach Organ bzw. Zellart, eventuell auch je nach Betarezeptorsubtyp unterschiedlich sein. Daher ist es vorstellbar, daß der Betarezeptor des menschlichen Herzens quantitativ oder funktionell durch Schilddrüsenhormone beeinflusst wird, ohne daß sich dies in einer Veränderung des lymphocytären Betarezeptors ausdrückt.

Andere Autoren (122) bestätigen die Theorie der erhöhten Katecholaminsensitivität des Herzens unter hyperthyreoter Stoffwechsellaage nicht. Sie vermuten, daß Schilddrüsenhormone eine eigene vom adrenergen System unabhängige positiv inotrope und chronotrope Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System ausüben. So erklärt man z.B. die Ruhetachykardie hyperthyreoter Tiere mit einer Erhöhung der diastolischen

Depolarisation und einer Verminderung der Aktionspotentialdauer im Sinusknoten. Am Kaninchen stellte man fest, daß Schilddrüsenhormone Einfluß auf die im Herzen vorhandenen Isoenzyme des Myosins haben: Die Aktivität einer ans Myosin gekoppelten ATP'ase beeinflußt die Geschwindigkeit der Kontraktion. Schilddrüsenhormone rufen bei Kaninchen eine Zunahme des Myosinisoenzym hervor, das eine hohe ATP'ase-Aktivität aufweist, wodurch insgesamt die Kontraktilität des Herzens steigt (122). Dies ist eine andere mögliche biochemische Grundlage der kardialen Wirkungen von Schilddrüsenhormonen am Menschen.

Es ist derzeit noch Gegenstand der Diskussion, welche der durch Schilddrüsenhormone ausgelösten Mechanismen die physiologisch relevanten sind.

4. Bedeutung der Untersuchung des Betarezeptors von Lymphocyten

Die Untersuchungen am Betarezeptor menschlicher Lymphocyten im Verhältnis zum Alter und zu einer hyperthyreoten Stoffwechsellaage stehen teilweise im Gegensatz zu klinischen Beobachtungen des adrenergen Systems unter diesen Bedingungen. Es ist daher wichtig, die all diesen Untersuchungen zugrunde liegende Annahme zu bedenken, ob Lymphocyten wirklich geeignet sind, den Betarezeptorstatus anderer Gewebe zu reflektieren.

Da es am Menschen kaum möglich ist, diese Frage durch parallele Bindungsstudien an verschiedenen Organen zu beantworten, untersuchten Aarons und Molinoff (88) an der Ratte, wie die Betarezeptoren von Lymphocyten, Herz- und Lungengewebe auf eine chronische Gabe von Propranolol reagieren. Die chronische Propranololverabreichung bewirkte eine 34%ige Zunahme der Beta₂-Rezeptoren der Lymphocyten, an Herz und Lunge waren 28% und 32% mehr Rezeptoren nachweisbar. Da der Rattenventrikel zumeist Beta₁-Rezeptoren,

die Rattenlunge überwiegend Beta_2 -Rezeptoren besitzen, bestand also kein Unterschied in der Reaktion dieser beiden Rezeptortypen. In diesem Modell waren Lymphocyten demnach als peripherer Indikator für eine Regulation beta-adrenerger Rezeptoren geeignet. An derselben Spezies und den gleichen Organen bzw. Zellen untersuchten Scarpace und Abrass (148) den Einfluß einer experimentell erzeugten Trijodthyronin-Hyperthyreose. Während an den Membranpräparationen des Herzens eine 60%ige Zunahme der Betarezeptoren festgestellt wurde, wiesen Lunge und Lymphocyten keine Änderung der Rezeptordichte auf. Die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase war sowohl im Herz- als auch im Lungengewebe der hyperthyreoten Tiere erhöht, was an Lymphocyten allerdings nicht nachweisbar war. Unter diesen Bedingungen war das lymphocytäre Betarezeptor-Adenylatzyklase-System nicht als repräsentatives Modell kardialer oder pulmonaler Betarezeptoren desselben Organismus verwendbar.

Um dieser Frage bezüglich des menschlichen Organismus näher zu kommen, versuchte man, klinische Daten, die Effekte adrenerger Stimulation bzw. Blockierung widergeben, mit Bindungsdaten an Blutzellen (Granulocyten und Lymphocyten) zu korrelieren. Brooks et al. (32) berichten, daß die klinische Schwere des Asthma bronchiale direkt positiv mit der Abnahme der Betarezeptoren von Lymphocyten korreliert. Dergleichen fand sich ein zeitlicher Zusammenhang zwischen einer erhöhten Sensitivität des kardio-vaskulären Systems und einer gesteigerten Betarezeptordichte menschlicher Lymphocyten nach abruptem Absetzen einer Propranololverabreichung (1). Diese klinischen Untersuchungen haben allerdings den Nachteil, daß es viele Faktoren wie z.B. Reninfreisetzung, Schilddrüsenhormonausschüttung etc. gibt, die gleichzeitig ablaufen könnten und auch zu einer der adrenergen Stimulation ähnlichen physiologischen Antwort führen. In einer Untersuchung an menschlichen Lymphocyten und an Lungengewebe wurde dargestellt, daß beide in gleicher Weise bezüglich ihrer Betarezeptorenzahl auf Agonisten und Antagonisten reagieren (42).

Beta₂-Rezeptoren menschlicher Granulocyten reagieren auf Situationen wie z.B. Therapie mit Agonisten, Hyperthyreose, cystischer Fibrose etc. ähnlich wie die der Lymphocyten (123). Fraser et al. (58) konstatierten, daß die Rezeptordichte von Granulocyten und Lymphocyten in gleicher Weise durch zirkulierende Katecholamine oder durch Propranolol reguliert werden. Davies und Lefkowitz (48) legten allerdings dar, daß Beta₂-Rezeptoren von Granulocyten und Lymphocyten eines Individuums auf dieselbe experimentelle Beeinflussung unterschiedlich reagieren. Stunden nach Cortisonapplikation kam es zu einer ca. 38%igen Zunahme der Betarezeptoren der Granulocyten, die Rezeptoren der Lymphocyten hingegen waren um 39% vermindert. Nach 24 Stunden konnte an den Granulocyten noch eine 19%ige Zunahme, an den Lymphocyten dann auch eine 22%ige Vermehrung gemessen werden.

Um die Wirkungen verschiedenster Einflußfaktoren auf das Betarezeptor-Adenylatzyklase-System eines Organismus genauer zu erforschen, wäre es daher in Zukunft erforderlich, mehrere Zellsysteme, z.B. Lymphocyten, Granulocyten und Fettzellen oder auch soweit wie möglich Organpräparate parallel zu untersuchen.

Die Erforschung des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems spielt beim Verständnis von Physiologie und Pathophysiologie vieler Zustände wie z.B. Alterungsvorgängen, Hypertonie, Hyperthyreose und Hypothyreose eine wichtige Rolle. Insbesondere der weite therapeutische Anwendungsbereich beta-blockierender (Angina pectoris, Hypertonie, Herzrhythmusstörungen, Hyperthyreose, Tremor) und beta-mimetischer (Asthma bronchiale, Schock) Pharmaka macht für die Beurteilung von Wirkungen und Nebenwirkungen ein Verständnis dieses Systems nötig. Es ergaben sich nämlich bei einer Reihe von Erkrankungen klinische und biochemische Hinweise auf Veränderungen an diesem System, so z.B. bei der Hyperthyreose (8, 90, 148, 171), atopischen Erkrankungen (160), besonders des Asthma bronchiale (43, 161), kon-

gestiver Kardiomyopathie (41), Pseudohypoparathyreoidismus (156) etc..

Ein Verständnis und eine individuelle Behandlung derartiger Erkrankungen ist nur möglich, wenn man weiß, welche Störung des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems vorliegt, wo das Pharmakon angreift und welche Auswirkungen es auf seinen Rezeptor hat.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Entwicklung hochaffiner radioaktiv markierter Beta-Antagonisten ist es möglich geworden, das schon in klassischen pharmakologischen Untersuchungen aufgestellte Modell der Alpha- und Beta-Rezeptoren biochemisch nachzuweisen. Des weiteren gelang es, das Wirkungsprinzip der durch beta-adrenerge Pharmaka hervorgerufenen biologischen Effekte teilweise aufzuklären: Beta-adrenerge Agonisten und Antagonisten besetzen mit hoher Affinität und Selektivität den Betarezeptor. Lediglich die Bindung der Agonisten aktiviert die Adenylatzyklase, was letztlich zur Aktivierung gewisser Stoffwechselprozesse führt. Eine Therapie mit Betarezeptor-blockierenden Substanzen wird bei vielen Krankheiten wie z.B. Hypertonie, Angina pectoris, Hyperthyreose etc. angewandt. Beta-mimetische Substanzen werden z.B. bei Schock, Asthma bronchiale, Bradykardie etc. eingesetzt. Wegen dieses weiten therapeutischen Gebrauchs ist das Verständnis des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems für einen gezielten Einsatz dieser Substanzen unumgänglich. Außerdem könnten Veränderungen an diesem System pathogenetische Bedeutung bei einer Reihe von Krankheiten wie z.B. Asthma bronchiale, Hypertonie oder den Auswirkungen einer hyperthyreoten Stoffwechsellage haben.

Um solche möglichen Veränderungen am Menschen feststellen zu können, untersuchten wir das Betarezeptor-Adenylatzyklase-System an intakten menschlichen mononukleären Zellen. Als radioaktiv markierter beta-adrenerger Antagonist stand uns (+)- ^{125}J -Cyanopindolol zur Verfügung. Durch die hier gezeigten Versuche wollten wir spezifische Bindungsstellen für (+)- ^{125}J -Cyanopindolol an intakten menschlichen mononukleären Zellen experimentell darstellen, charakterisieren und quantifizieren.

Mit zunehmenden Alter nimmt die Sensitivität des menschlichen Herzens gegenüber Katecholaminen ab, was auf einer

Veränderung der Betarezeptorendichte beruhen könnte. Die klinischen Symptome einer hyperthyreoten Stoffwechsellage ähneln denen einer durch Katecholamine ausgelösten Stimulation, was auch der guten therapeutischen Wirksamkeit von Betablockern bei Hyperthyreose entspricht. Da die Katecholaminspiegel dabei nicht verändert sind, könnten die pathogenetischen Mechanismen für diese Symptome in einer erhöhten Ansprechbarkeit des adrenergen Systems begründet sein. Eine mögliche Abhängigkeit der Affinität oder der Zahl der Betarezeptoren vom Alter, vom Geschlecht oder unter dem Einfluß einer hyperthyreoten Stoffwechsellage wurden untersucht.

1. Spezifische Bindungsstellen für (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol

Für den Nachweis einer spezifischen Pharmakon-Betarezeptor-Bindung wurden folgende Kriterien aufgestellt: Die Bindung muß schnell, reversibel, stereospezifisch, von hoher Affinität und sättigbar sein.

Die Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol konnte durch (-)- und (+)-Propranolol in Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-6} M stereospezifisch gehemmt werden, in höheren Konzentrationen war dies nicht mehr möglich. An Zellen, die bei 23°C 24 Std. lang wärmedenaturiert worden waren, wurde die Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol erst in Konzentrationen über 10^{-6} M gehemmt, wobei keine Stereospezifität nachweisbar war. Die Stereospezifität erweist sich somit als wichtigstes Kriterium zum Nachweis spezifischer beta-adrenerger Bindungsstellen. Aus konzentrationsabhängigen Bindungsversuchen mit beta-adrenergen Agonisten und dem Vergleich ihrer Potenz, die Bindung von (+)-¹²⁵J-Cyanopindolol zu hemmen, ergab sich die für Beta₂-Rezeptoren typische Reihenfolge: Isoprenalin > Adrenalin > Noradrenalin.

Die Dissoziationskonstante radioaktiv markierter beta-adrenerger Antagonisten kann durch 2 Methoden ermittelt werden: (1) durch kinetische Bindungsexperimente und (2) durch Bindungsversuche im Äquilibrium.

In den kinetischen Versuchen ergab sich eine Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von: $k_{+1} = 0,93 \pm 0,07 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min.}^{-1}$. Bei der Dissoziationsreaktion erhielten wir eine biphasische Reaktion mit zwei Geschwindigkeitskonstanten:

$$k_{-1} = 0,91 \pm 0,11 \times 10^{-2} \text{ min.}^{-1} \text{ und}$$

$$k_{-2} = 8,07 \pm 0,38 \times 10^{-2} \text{ min.}^{-1}.$$

Der aus der schnell dissoziierenden Komponente (k_{-1}) errechnete Wert für die Dissoziationskonstante ($K_D = 0,98 \times 10^{-10} \text{ M}$) stimmt gut mit dem aus Äquilibriumuntersuchungen erhaltenen Wert ($K_D = 1,98 \times 10^{-10} \text{ M}$) überein. Die biphasische Dissoziationsreaktion könnte durch das Vorliegen des radioaktiven Liganden als Racemat bedingt sein. In der grafischen Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard ergaben sich aber stets Geraden, die auf eine homogene Rezeptorpopulation ohne kooperative Effekte schließen lassen.

2. Quantifizierung der Betarezeptoren mononukleärer Zellen

Mittels der Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard ist es möglich, Betarezeptoren intakter menschlicher mononukleärer Zellen zu quantifizieren. Dabei zeigte sich, daß die Zahl der Betarezeptoren intra- und interindividuelle Streuungen aufweist: die intraindividuelle Streuung liegt maximal zwischen 874 bis 4430 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle. Insgesamt besitzt die intakte menschliche mononukleäre Zelle zwischen 779 bis 5502 Betarezeptoren mit einem Mittelwert von 2639 ± 125 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle.

3. Einfluß des Alters und des Geschlechts auf die Zahl der Betarezeptoren mononukleärer Zellen

Um zu prüfen, ob sich die Zahl oder Affinität der Betarezeptoren mit zunehmendem Alter verändern oder geschlechtsabhängig sind, untersuchten wir 77 Personen (36 Frauen,

41 Männer) im Alter von 17 bis 86 Jahren, wobei wir diese in 2 Gruppen, eine von 17-45 Jahre, die andere von 46-86 Jahre einteilten. Die Zahl der Betarezeptoren/mononukleäre Zelle betrug für die erste Gruppe 2562 ± 155 ($K_D = 212 \pm 15 \text{ pM}$) und für die zweite Gruppe 2802 ± 213 ($K_D = 178 \pm 15 \text{ pM}$). Es ergab sich somit, daß das Alter keinen Einfluß auf die Zahl und Affinität der Betarezeptoren menschlicher mononukleärer Zellen ausübt. Ebenso zeigte sich zwischen Männern (2617 ± 187 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle) und Frauen (2708 ± 161 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle) kein Unterschied.

4. Einfluß einer hyperthyreoten Stoffwechsellage auf die Zahl und Affinität der Betarezeptoren

An 10 Patienten mit gesicherter hyperthyreoter Stoffwechsellage untersuchten wir die Zahl und Affinität der Betarezeptoren der mononukleären Zellen. Dabei ergaben sich für die Zahl der Rezeptoren ein Mittelwert von 2880 ± 278 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle und für die Dissoziationskonstante $K_D = 153 \pm 19 \text{ pM}$. Verglichen mit den Werten der Personen des Gesamtkollektivs (2659 ± 125 Betarezeptoren/mononukleäre Zelle und $K_D = 198 \pm 19 \text{ pM}$) besteht somit kein signifikanter Unterschied. Eine hyperthyreote Stoffwechselsituation wirkt sich demnach nicht auf die Zahl oder Affinität der Betarezeptoren intakter menschlicher mononukleärer Zellen aus.

Es konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, an intakten menschlichen mononukleären Zellen die Affinität und die Zahl der Betarezeptoren reproduzierbar zu messen und Aussagen über die Einflüsse des Alters, des Geschlechts und der Hyperthyreose auf diese Parameter zu treffen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. AARONS, R.D., NIES, A.S., GAL, J., HEGSTRAND, L.R.:
Elevation of beta-adrenergic receptor density in human lymphocytes after propranolol administration.
J.Clin.Invest. 65, 949-957 (1980)
2. ABRASS, I.B., SCARPACE, P.J.:
Human lymphocyte beta-adrenergic receptors are unaltered with age.
J.of Gerontology 36, 3, 298-301 (1981)
3. AHLQUIST, R.P.:
Adrenergic beta-blocking agents.
Prog.Drug Res. 20, 27-42 (1976)
4. AHLQUIST, R.P.:
A study of the adrenotropic receptors.
Am.J.Physiol. 153, 586-600 (1948)
5. ALBRIGHT, F., BURNETT, C.H., SMITH, P.H. and PARSON, W.:
Pseudo-hypoparathyroidism - an example of "seabright-bantam syndrome" .
Endocrinology 30, 922-932 (1942)
6. ALEXANDER, R.W., DAVIS, J., LEFKOWITZ, R.J.:
Direct identification and characterization of beta-adrenergic receptors in rat brain.
Nature 258, 437 (1975)
7. ALEXANDER, R.W., WILLIAMS, L.T., LEFKOWITZ, R.J.:
Identification of cardiac beta-adrenergic receptors by (-)-[³H]-alprenolol binding.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 1564-1568 (1975)
8. ANDERSSON, R.G., NILSSON, O.R. and KRO, J.F.:
Beta-adrenoceptor-adenosine 3',5'-monophosphate system in human lymphocytes before and after treatment for hyperthyroidism.
J.of Clin.Endocrin. and Metab. 56, 1, 42-45 (1983)

9. ATLAS, D., STEER, M.L., LEVITZKI, A.:
Stereospecific binding of propranolol and catecholamines to the beta-adrenergic receptor.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 4246-4248 (1974)
10. AURBACH, G.D., FEDAK, S.A., WOODARD, C.J., PALMER, J.S., HAUSER, D., TROXLER, F.:
The beta-adrenergic receptor: Stereospecific interaction of an iodinated beta-blocking agent with a high affinity site.
Science 186, 1223-1224 (1974)
11. BAER, M., PORZIG, H.:
Cell metabolism affects the density of beta-adrenergic receptors in intact rat reticulocytes.
FEBS Letters 111, 1, 205-208 (1980)
12. BANERJEE, S.P., SHARMA, V.K., KUNG, L.S.:
Beta-adrenergic receptors in innervated and denervated skeletal muscle.
Biochem.Biophys.Acta 470, 123-127 (1977)
13. BAR, R.S., GORDEN, P., ROTH, J., KAHN, C.R.:
Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients.
The J.of Clin.Invest. 58, 1123-1135 (1976)
14. BARGER, G., and DALE, H.H.:
Chemical structure and sympathomimetic action of amines
J.Physiol. 41, 19-59 (1910)
15. BARNES, P.J., DOLLERY, C.J., and MAC DERMOT, J.:
Increased pulmonary alpha-adrenergic and reduced beta-adrenergic receptors in experimental asthma.
Nature 285, 569-571 (1980)
16. BAROVSKY, K., and BROOKER, G.:
(-)- [¹²⁵I]-Iodopindolol, a new highly selective radio-iodinated beta-adrenergic receptor antagonist:
Measurement of beta-receptors on intact rat astrocytoma cells.
J.Cyclic Nucleotide Res. 6, 297-307 (1980)

17. BATAILLE, D., FREYCHET, P., ROSSELIN, G.;
Interactions of glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell membranes: Binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase.
Endocrinology 95, 713-721 (1974)
18. BERLAN, M., LAFONTAN, M.:
Identification of α_2 -adrenergic receptors in human fat cell membranes by [^3H]-clonidine binding.
Eur.J.Pharmacol. 67, 481-484 (1980)
19. BEUCKELMANN, D.:
Quantitative Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten und der Selektivität von Adrenozeptorantagonisten und -agonisten an β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren der unreifen Erythrocytenmembran der Ratte.
Inauguraldissertation, Frankfurt (1982)
20. BILEZIKIAN, J.P., LOEB, J.N., and GAMMON, D.E.:
The influence of hyperthyroidism on the beta-adrenergic responsiveness of the turkey erythrocyte.
J.Clin.Invest. 63, 184-192 (1979)
21. BISHOPRIC, N.H., COHEN, H.J., LEFKOWITZ, R.J.:
Beta adrenergic receptors in lymphocyte subpopulations.
J.Allerg.Clin.Immunolog. 65, 1, 29-33 (1981)
22. BÖYUM, A.:
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21, Suppl.97, 9 (1968)
23. BOEYNAEMS, J.M., and DUMONT, J.E.:
Quantitative analysis of the binding of ligands to their receptors.
J.Cyclic Nucleotide Res. 1, 123-142 (1975)
24. BOURNE, H.R., LICHTENSTEIN, L.M., MELMON, K.L., HEMEY, C.S., WEINSTEIN, Y., SHEARER, G.M.:
Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP.
Science 184, 19-28 (1974)

25. BRANDSLUND, I., RASMUSSEN, J.M., FISHER, D.,
SVEHAG, S.-E.:
Separation of human peripheral blood monocytes on
continuous density gradients of polyvinylpyrrolidone-
coated silica gel.
J.of Immunolog.Methods 48, 199-211 (1982)
26. BRITTAİN, R.T., JACK, D., RITCHIE, A.C.:
Recent beta-adrenoceptor stimulants.
Adv.Drug Res. 5, 197-253 (1976)
27. BRODDE, O.-E.:
Endogenous and exogenous regulation of human alpha-
and beta-adrenergic receptors.
J.of Receptor Res. 3, 1.u.2, 151-162 (1983)
28. BRODDE, O.-E.:
Homogenous class of beta-1-adrenergic receptors in
rat kidney.
Biochem.Pharmacol. 31, 9, 1743-1747 (1982)
29. BRODDE, O.-E., ENGEL, G., HOYER, D., BOCK, U.D.,
WEBER, F.:
The beta-adrenergic receptor in human lymphocytes:
subclassification by the use of a new radio-ligand,
(+)-¹²⁵Iodocyanopindolol.
Life Sciences 29, 2189-2198 (1981)
30. BRODDE, O.-E., KUHLOFF, F., ARROYO, J., PRYWARRA, A.:
No evidence for temperature-dependant changes in the
pharmacological specificity of beta₁-and beta₂-adreno-
ceptors in rabbit lung membranes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 322, 20-28 (1983)
31. BRODDE, O.E., SCHUMANN, H.J., WAGNER, J.:
Decreased responsiveness of adenylate cyclase system
on left atria from hypothyroid rats.
Mol.Pharmacol. 17, 180-186 (1980)

32. BROOKS, S.M., MC GOWAN, K., BERNSTEIN, I.L., ALTENAU, P.,
and PEAGLER, J.:
Relationship between numbers of beta adrenergic
receptors in lymphocytes and disease severity in asthma.
J.Allergy Clin.Immunol. 63, 6, 401-406 (1979)
33. BÜRGISSER, E., HANCOCK, A.A., LEFKOWITZ, R.J.,
DE LEAN, A.:
Anomalous equilibrium binding properties of high-
affinity racemic ligands.
Mol.Pharmacol. 19, 205-216 (1981a)
34. BÜRGISSER, E., LEFKOWITZ, R.J., DE LEAN, A.:
Alternative explanation for the apparent "two-step"
binding kinetics of high affinity racemic antagonist
radioligands.
Mol.Pharmacol. 19, 509-512 (1981b)
35. CARLSSON, E., ABLAD, B., BRANDSTROM, A., CARLSSON, B.:
Differentiated blockade of the chronotropic effects
of various adrenergic stimuli in the cat heart.
Life Sci. 11, 953-958 (1972)
36. CASSEL, D., and SELINGER, Z.:
Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera-
toxin. Inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory
site.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 3307-3311 (1977)
37. CHANG, R.S.L., SNYDER, S.H.:
Benzodiazepine receptors: labeling in intact animals
with ³H-flunitrazepam.
Eur.J.Pharmacol. 48, 213-218 (1978)
38. CHUANG, D.M., KINNIER, W.J., FABER, L., and COSTA, E.:
A biochemical study of receptor internalization during
beta-adrenergic receptor desensitization in frog
erythrocytes.
Mol.Pharmacol. 18, 348-355 (1980)

39. CICARALDI, T., and MARINETTI, G.V.:
Hormone action at the membrane level VIII. Adrenergic receptors in rat heart and adipocytes and their modulation by thyroxine.
Biochem.Biophys.Acta 541, 334-346 (1978)
40. CLARK, A.J.:
The mode of action of drugs on cells.
Williams and Wilkins, Baltimore (1933)
41. COLUCCI, W.S., ALEXANDER, R.W., WILLIAMS, G.H., RUDE, R.E., HOLMAN, B.L., KONSTAM, M.A., WYNNE J., MUDGE, G.H., and BRAUNWALD, E.:
Decreased lymphocyte beta-adrenergic-receptor density in patients with heart failure and tolerance to the beta-adrenergic agonist pirbuterol.
N.Engl.J.Med. 305, 185-190 (1981)
42. CONOLLY, M.E., and GREENACRE, J.K.:
The beta-adrenoceptor of the human lymphocyte and human lung parenchyma.
Br.J.Pharmacol. 59, 17-23 (1977)
43. CONOLLY, M.E., GREENACRE, J.K.:
The lymphocyte beta-adrenoceptor in normal subjects and patients with bronchial asthma.
J.of Clin.Invest. 58, 1307-1316 (1976)
44. COULOMBE, P., DUSSAULT, J.H., WALKER, P.:
Plasma catecholamine concentrations in hyperthyroidism and hypothyroidism.
J.of Clin.Endocrin.and Metab. 25, 973-979 (1976)
45. CUATRECASAS, P.:
Insulin receptor of liver and fat cell membranes.
Fed.Proc. 32, 1838-1946 (1973)
46. CUATRECASAS, P., HOLLENBERG, M.D.:
Binding of insulin and other hormones to non-receptor materials : saturability, specificity and apparent "negative cooperativity".
Biochem.Biophys.Res.Comm. 62, 31-41 (1975)

47. DALE, H.H.:
On some physiological actions of ergot.
J.of Physiol, 34, 163-206 (1906)
48. DAVIES, A.O., LEFKOWITZ, R.J.:
Corticosteroid-induced differential regulation of beta-adrenergic receptors in circulating human polymorph-nuclear leukocytes and mononuclear leukocytes.
J.of Clin.Endocrin.and Metab., 51, 3, 599-605 (1980)
49. DAVIES, B., SUDERA, D., MATHIAS, C., BANNISTER, R., SEVER, R.:
Beta-receptors in orthostatic hypotension.
N.Engl.J.Med. 305, 1017-1019 (1981)
50. DOYLE, V., O'MALLEY, K., KELLY, J.G.:
Human lymphocyte beta-adrenoceptor density in relation to age and hypertension.
J.of Cardiovasc.Pharmacol. 4, 738-740 (1982)
51. DULIS, B.V., WILSON, I.B.:
The beta-adrenergic receptor of live human polymorph-nuclear leukocytes.
J.of Biol.Chem. 255, 3, 1043-1048 (1980)
52. EHRLICH, P.:
On partial functions of the cell; Nobel lecture:
In the collected papers of P. Ehrlich, Vol. III, 183
(F. Himmelweit, M. Marquardt, and H. Dale, eds.).
Pergamon Press, Oxford (1956)
53. ENGEL, G.:
Identification of different subgroups of beta-receptors by means of binding studies in guinea-pig and human lung.
Triangle 19, 69-76 (1980)
54. ENGEL, G., HOYER, D., BERTHOLD, R., WAGNER, M.:
(+)[¹²⁵Iodo]cyanopindolol, a new ligand for beta-adrenoceptors: identification and quantitation of subclasses of beta-adrenoceptors in guinea-pig.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 317, 277-285 (1981)

55. ERDMANN, E.:
Cell membrane receptors for cardiac glycosides in the heart.
Basic Res.Cardiol. 72, 315-325 (1977)
56. ERDMANN, E., HASSE, W.:
Quantitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes.
J.Physiol. 251, 671-682 (1975)
57. ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in (Na^+/K^+)-ATP-ase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants.
Biochem.Biophys.Acta 307, 386-398 (1973)
58. FRASER, J., NADEAU, J., ROBERTSON, D., WOOD, A.J.J.:
Regulation of human leukocyte beta-receptor by endogenous catecholamines: relationship of leukocyte beta receptor density to the cardiac sensitivity to isoproterenol.
J.of Clin.Invest. 67, 1777-1784 (1981)
59. GALANT, S.P., DURISETI, L., UNDERWOOD, D.S., ALLRED, S., INSEL, P.A.:
Beta adrenergic receptors of polymorphnuclear particulates in bronchial sthma.
J.of Clin.Invest. 65, 577-585 (1980)
60. GALANT, S.P., DURISETI, L., UNDERWOOD, S., INSEL, P.A.:
Decreased beta-adrenergic receptors on polymorphnuclear leukocytes after adrenergic therapy.
N.Engl.J.Med. 299, 933-936 (1978)
61. GALANT, S.P., UNDERWOOD, S., DURISETI, L., INSEL, P.A.:
Characterization of high affinity beta₂-adrenergic receptor binding of ($-\text{[}^3\text{H]}$)dihydroalprenolol to human polymorphnuclear cell particulates.
J.Lab.Clin.Med. 92, 613-618 (1978)

62. GALANT, S.P., UNDERWOOD, S., LUNDAK, T.C., GRONCY, C.C.;
and MOURATIDES, D.I.:
Heterogeneity of human lymphocytes subpopulations to
pharmacologic stimulation.
I.Lymphocyte responsiveness to beta-adrenergic agents.
J.All.Clin.Immunolog. 62, 349 (1978)
63. GERBER, G.S., NIES, A.S.;
Abrupt withdrawal of cardiovascular drugs.
N.Engl.J.Med. 301, 1234-1235 (1979)
64. GINSBERG, A.M., CLUTTER, W.E., SHAH, S.D., CRYER, P.E.:
Triiodothyronine-induced thyrotoxicosis increases mono-
nuclear leukocyte beta-adrenergic receptor density in
man.
J.of Clin.Invest. 67, 1785-1791 (1981)
65. GUIDICELLI, Y., and PEQUERY, R.:
Beta-adrenergic receptors and catecholamine sensitive
adenylate cyclase in rat fat cell membranes: influence
of growth, cell site and aging.
Europ.J.of Biochem. 90, 413-419 (1978)
66. HANCOCK, A.A., DE LEAN, A.L., and LEFKOWITZ, R.J.:
Quantitative resolution of beta-adrenergic receptor
subtypes by selective ligand binding: application of
a computerized model fitting technique.
Mol.Pharmacol. 16, 1-9 (1979)
67. HARDEN, T.K., WOLFE, B.B., MOLINOFF, P.B.:
Binding of iodinated beta-adrenergic antagonists to
protein derived from rat heart.
Mol.Pharmacol. 12, 1-15 (1976)
68. HAYASHIDA, D., LEUNG, R., GOLDFIEN, A., ROBERTS, J.M.:
Human myometrial adrenergic receptors: identification
of beta-adrenergic receptors with dihydroalprenolol.
Am.J.Obstet.Gynecol. 142, 389-393 (1982)
69. HOFFMANN, B.B., LEFKOWITZ, R.J.:
Alpha-adrenergic receptor subtypes.
N.Engl.J.Med. 302, 1390-1396 (1980)

70. HOYER, D., ENGEL, G., BERTHOLD, R.:
Binding characteristics of (+), (+) and (-) [125 Iodo-]
cyanopindolol to guinea-pig left ventricle membranes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 318, 319-329 (1982)
71. HUI, K.K., KITTELLE, J., WOLFE, R.N., BORST, S.,
CONOLLY, M.E.:
Extracellular magnesium is not required for beta-
adrenergic drug-receptor interactions in intact
human lymphocytes.
Life Sci. 29, 523-530 (1981)
73. HUNTER, W.M., GREENWOOD, H.:
Preparation of 131 iodine labeled human growth hormone
of high specific activity.
Nature 194, 495-496 (1962)
74. INSEL, P.A., MAGUIRE, M.E., GILMAN, A.G., BOURNE, H.R.,
COFFINO, P., MELMON, K.L.:
Beta adrenergic receptors and adenylate cyclase:
Products of separate genes?
Mol.Pharmacol. 12, 1062-1069 (1976)
75. INSEL, P.A., SANDA, M.:
Temperature-dependant changes in binding to beta-
adrenergic receptors of intact S 49 lymphoma cells.
J.of Biol.Chem. 254, 14, 6554-6559 (1979)
76. INSEL, P.A., and STOLMAN, L.M.:
Radioligand binding to beta adrenergic receptors of
intact cultured S 49 lymphoma cells.
Mol. Pharmacol. 14, 549-561 (1978)
77. JACOBS, S., and CUATRECASAS, P.:
The mobile receptor hypothesis for cell membrane receptor
action.
Trends in Biochem.Sci. 280-282 (1977)
78. JARNES, P.J., KARLINOR, J.S., DOLLERY, C.T.:
Human lung adrenoceptors studied by radioligand binding.
Clin.Sci. 58, 457-461 (1980)

79. JERRELS, T.R., DEAN, J.H., RICHARDSON, G.L.,
HERBERMANN, R.B.:
Depletion of monocytes from human peripheral blood
mononuclear leukocytes: comparison of the sephadex
G-10-column method with other commonly used techniques.
J. of Immunolog. Methods 32, 11-29 (1980)
80. JOHNSON, G.L., WOLFE, B.B., HARDEN, T.K., MOLINOFF, P.B.,
PERKINS, J.P.:
Role of beta-adrenergic receptors in catecholamine-
induced desensitization of adenylate cyclase in human
astrocytoma cells.
J.Biol.Chem. 253, 1472-1480 (1978)
81. KENDALL, M.J., WOODS, K.L., WILKINS, M.R., WORTHINGTON,
D.J.:
Responsiveness to beta-adrenergic receptor stimulation:
the effects of age are cardioselective.
Br.J.Clin.Pharmacol. 14, 821-826 (1982)
82. KRAFT, C.A., CASTLEDEN, C.M.:
The effect of aging on beta-adrenoceptor-stimulated
cyclic AMP formation in human lymphocytes.
Clin.Sci. 60, 587-589 (1981)
83. KRALL, J.F., CONOLLY, M.E., TUCK, M.L.:
Evidence for reversibility of age-related decrease
in human lymphocyte adenylate cyclase activity.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 99, 3, 1028-1034 (1981)
84. KRALL, J.F., CONOLLY, M.E., TUCK, M.L.:
Acute regulation of beta-adrenergic catecholamine
sensitivity in human lymphocytes.
J.of Pharmacol. and Exp.Therap. 214, 3, 554-560 (1980)
85. KRALL, J.F., CONOLLY, M.E., WEISBART, R., and TUCK, M.L.:
Age-related elevation of plasma catecholamine con-
centration and reduced responsiveness of lymphocyte
adenylate cyclase.
J.of Clin.Endocrin. and Metab. 52, 5, 863-867 (1981)

86. KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Specific and unspecific binding of (-)-³H-Dihydro-
alprenolol to cardiac tissue.
Biochem.Pharmacol. 28, 1283-1288 (1979)
87. KRAWIETZ, W., POPPERT, D., ERDMANN, E., GLOSSMANN, H.,
STRUCK, C.J., KONRAD, C.:
Beta-adrenergic receptors in guinea-pig myocardial
tissue.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 295, 215-224 (1976)
88. KRAWIETZ, W., WEINSTEIGER, M., PRUCHNIEWSKI, M.,
ERDMANN, E.:
Evidence for negative cooperativity among cardiac beta-
adrenergic receptors in cardiac and lung tissue of
guinea-pig.
Biochem.Pharmacol. 28, 2999-3007 (1979)
89. KRAWIETZ, W., WERDAN, K., and ERDMANN, E.:
Effect of thyroid status on beta-adrenergic receptor,
adenylate cyclase activity and guanine nucleotide regu-
latory unit in rat cardiac and erythrocyte membranes.
Biochem.Pharmacol. 31, 15, 2463-2469 (1982)
90. KRAWIETZ, W., WERDAN, K., SCHOBER, M., ERDMANN, E.:
Different numbers of beta-receptors in human lymphocyte
subpopulations.
Biochem.Pharmacol. 31, 1, 133-136 (1982)
91. KUNOS, G.:
Modulation of adrenergic reactivity and adrenoceptors
by thyroid hormones.
In: Adrenoceptors and catecholamine action (ed. Kunos,
G.) John Wiley and Sons (1981)
92. LANDMANN, R., BITTIGER, H., BÜHLER, F.R.:
High affinity beta-2-adrenergic receptors in mononuclear
leukocytes: similar density in young and old normal
subjects.
Life Sci. 29, 1761-1771 (1981)

93. LANDMANN, R., BÜRGISSER, E., BÜHLER, F.R.:
Human lymphocytes as a model for beta-adrenergic
receptors in clinical investigation.
J.of Receptor Res. 3, 1 u.2, 71-88 (1983)
94. LANDS, A.M., ARNOLD, A., MC AUCLIFF, J.P., LUDUENA,
F.P., BROWN, T.G.:
Differentiation of receptor systems activated by
sympathomimetic amines.
Nature 214, 597-598 (1967a)
95. LANDS, A.M., LUDUENA, F.P., BUZZO, H.J.:
Differentiation of receptors responsive to isoproterenol.
Life Sci. 6, 2241-2249 (1967b)
96. LANGLEY, J.N.:
On the reaction of cells and of nerve-endings to certain
poisons, chiefly as regards the reaction of striated
muscle to nicotine and to curari.
J.Physiol. 33, 374-413 (1906)
97. LEFKOWITZ, R.J., MULLIKIN, D., and CARON, M.G.:
Regulation of beta-adrenergic receptors by guanyl-
5'-yl imidophosphate and other purine nucleotides.
J.Biol.Chem. 251, 4686-4692 (1976)
98. LEFKOWITZ, R.J., MURKHERJEE, C., COVERSTONE, M.,
CARON, M.G.:
Stereospecific ³H-(-)-alprenolol binding sites, beta-
adrenergic receptors and adenylate cyclase.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 60, 703-709 (1974)
99. LEFKOWITZ, R.J., SHARP, G.W.G., HABER, E.:
Specific binding of beta-adrenergic catecholamines to
a subcellular fraction from cardiac muscle.
J.Biol.Chem. 248, 342-349 (1973)
100. LEFKOWITZ, R.J., and WILLIAMS, L.T.:
Catecholamine binding to the beta-adrenergic receptor.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 515-519 (1977)

101. LESKO, L., MARINETTI, G.V.:
Hormone action at the membrane level IV. Epinephrine binding to rat liver plasma membranes and rat epididymal fat cells.
Biochem.Biophys.Acta 382, 419-436 (1975)
102. LESNIAK, M.A., GORDEN, P., ROTH, J., GAVIN, J.R.:
Binding of ^{125}I -human growth hormone to specific receptors in human cultured lymphocytes. Characterization of the interaction and a sensitive radioceptor assay.
J.Biol.Chem. 249, 1661-1667 (1974)
103. LEVITZKI, A., ATLAS, D., STEER, M.L.:
The binding characteristics and number of beta-adrenergic receptors on turkey erythrocyte.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 71, 2773-2776 (1974)
104. LIMBIRD, L.E., GILL, D.M., STADEL, J.M., HICKEY, A.R., and LEFKOWITZ, R.J.:
Loss of beta-adrenergic receptor-guanine nucleotide protein interactions accompanies decline in catecholamine responsiveness of adenylate cyclase in maturing rat erythrocytes.
J.Biol.Chem. 255, 1854-1961 (1980b)
105. LIMBIRD, L.E., and LEFKOWITZ, R.J.:
Resolution of beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase activity by gel exclusion chromatography.
J.Biol.Chem. 252, 799-802 (1977)
106. LINEWEAVER, H., BURK, D.:
The determination of enzyme dissociation constants.
J.Am.Chem.Soc. 56, 658-666 (1934)
107. LIPKIN, D., COOK, W.M., MARHAM, R.:
Adenosine-3'-5'-phosphoric acid: a proof of structure.
J.Am.Chem.Soc. 81, 6198-6203 (1959)
108. MADLER, T.W.:
Einfluß von Trijodthyronin auf die Rezeptor-Enzym-Systeme für Katecholamine und Herzglykoside.-Experimentelle Untersuchung an Herz-und Lungenmembranen von Meerschweinchen
Inauguraldissertation, München (1982)

109. MAGGI, A., SCHMIDT, M.J., GHETTI, B., EMNA, S.J.:
Effect of aging on neurotransmitter receptor binding
in rat and human brain.
Life Sci. 24, 367-373 (1979)
110. MAGUIRE, M.E., WIKLUND, R.A., ANDERSSON, H.J.,
GILMAN, A.G.:
Binding of ^{125}I -iodohydroxybenzylpindolol to putative
beta-adrenergic receptors of rat glioma cells and
other cell clones.
J.Biol.Chem. 251, 1221-1231 (1976)
111. MAKINODAN, T., GOOD, R.T., and KAY, M.M.B.:
Cellular basis of immunosenescence.
In: Comprehensive Immunology, Vol.1 (eds. by Good, R.A.,
and Day, S.B., 9-22)
Plenum Medical Book Company, New York (1977)
112. MALBON, C.C., MORENO, F.J., CABELLI, R.J., and FAIN, J.N.:
Fat cell adenylate cyclase and beta-adrenergic receptors.
J.Biol.Chem. 253, 671-678 (1978)
113. MARINETTI, G.V., RAY, T.K., TOMASI, V.:
Glucagon and epinephrine stimulation of adenylyl cyclase
in isolated rat liver plasma membranes.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 36, 185-193 (1969)
114. MARINETTI, G.V., ROSENFELD, S.I., THIEM, P.A.,
CONDEMI, J.J., and LEDDY, J.P.:
Beta-adrenergic receptors of human leukocytes. Studies
with intact mononuclear and polymorphnuclear cells and
membranes comparing two radioligands in the presence
and absence of chloroquine.
Biochem.Pharmacol. 32, 13, 2033-2043 (1983)
115. MARKOVAC, J., ERICKSON, R.P., HIEBER, V.:
Increased cyclic AMP levels and beta-adrenergic ant-
agonist binding in cystic fibrosis fibroblasts.
Biochem.Med. 26, 299-306 (1981)

116. MENDELSON, S., and NORBERG, J.:
Adenyl cyclase and cyclic AMP in T and B lymphocytes.
Proceedings of the 12th International Leukaemia
Conference, Beersheba, Israel, 1978
117. MIDDEKE, M., REMIEN, J., BLOCK, L.H., KIRZINGER, S.,
LANDROCK, A., HOLZGREVE, H.:
Beta₂-adrenoceptor density on membranes and on intact
mononuclear cells in essential hypertension.
Res.Exp.Med. 183, 227-232 (1983)
118. MINNEMAN, K.P., HEGSTRAND, L.R., and MOLINOFF, P.B.:
Simultaneous determination of beta₁- and beta₂-
adrenergic receptors in tissues containing both
receptor subtypes.
Mol.Pharmacol. 16, 34-36 (1979)
119. MINNEMAN, K.P., PITTMAN, R.N., and MOLINOFF, P.B.:
Beta-adrenergic receptor subtypes: properties,
distribution and regulation.
Ann.Rev.Neurosci. 4, 419-461 (1981)
120. MOLINOFF, P.B., and AARONS, R.D.:
Effects of drugs on beta-adrenergic receptors on human
lymphocytes.
J.of Cardiovasc.Pharmacol. 5, S 63-S 67 (1983)
121. MOORE, W.V., WOLFF, J.:
Thyroid-stimulating hormone binding to beef thyroid
membranes. Relation to adenylate cyclase activity.
J.Biol.Chem. 149, 6255-6263 (1974)
122. MORKIN, E., FLINK, I.L., and GOLDMAN, S.:
Biochemical and physiologic effects of thyroid hormone
on cardiac performance.
Progress in Cardiovasc.Disease 25, 5, 435-564 (1983)
123. MOTULSKY, H.J., and INSEL, P.A.:
Adrenergic receptors in man: direct identification,
regulation, and clinical alterations.
N.Engl.J.Med. 307, 18-29 (1982)

124. MURKHERJEE, C., CARON, M.G., COVERSTONE, M.,
LEFKOWITZ, R.J.:
Identification of adenylate cyclase-coupled beta-
adrenergic receptors in frog erythrocytes with [^3H]-
(-)-Alprenolol.
J.Biol.Chem. 250, 4869-4876 (1975)
125. NAHORSKI, S.R.:
Identification and significance of beta-adrenoceptor
subtypes.
Trends in Pharmacol.Sci. 2, 95-98 (1981)
126. NARAYANAN, N., and DERBY, J.-A.:
Alterations in the properties of beta-adrenergic
receptors of myocardial membranes in aging: impairments
in agonist-receptor interactions and guanine nucleotide
regulation accompany diminished catecholamine-respon-
siveness of adenylate cyclase.
Mechanisms of Aging and Development 19, 127-139 (1982)
127. ORLY, J., and SCHRAMM, M.:
Coupling of catecholamine receptor from one cell with
adenylate cyclase from another cell by cell fusion.
Proc.Natl.Acad.Sci. 73, 4410-4414 (1976)
128. PAIETTA, E., HOYER, D., ENGEL, G., SCHWARZMAIER, J.D.:
Non-specific uptake of the radioligand ^{125}I -HYP by
intact human lymphocytes: reversal of the uptake process.
Mol.and Cell.Endocrin. 25, 267-276 (1982)
129. PATIL, P.N., MILLER, D.D., TREDELENBURG, U.:
Molecular geometry and adrenergic drug activity.
Pharmacol.Rev. 26, 323-392 (1975)
130. PATIL, P.N., RUFFOLO, R.R.:
Evaluation of adrenergic alpha- and beta-receptor acti-
vators and adrenergic alpha- and beta-receptor blocking
agents.
In: Adrenergic activators and inhibitors. Part I (eds.:
Szekeres, L., Springer Verlag Berlin, Heidelberg,
New York, 1980)

131. PERTOFT, H., JOHNSON, A., WÄRMEGÅRD, B., SELJELID, R.:
Separation of human monocytes on density gradients
of Percoll.
J.of Immunolog.Methods 33, 221-229 (1980)
132. POCHET, R., DELESPESE, G., GAUSSET, P.W., COLLET, H.:
Distribution of beta-adrenergic receptors on human
lymphocyte subpopulations.
Clin.Exp.Immunology 38, 578-584 (1979)
133. POHL, S.L., KRAUS, H.M.J., BIRNBAUMER, L., RODBELL, M.:
Inactivation of glucagon by plasma membranes of rat
liver.
J.Biol.Chem. 247, 2295-2301 (1972)
134. PORZIG, H.:
Are there differences in the beta-receptor-adenylate-
cyclase systems of fragmented membranes and living cells?
TIPS, Febr., 75-78 (1982)
135. PORZIG, H., BAER, M., CHANTON, C.:
Properties of beta-adrenoceptor sites in metabolizing
and non-metabolizing rat reticulocytes and in resealed
reticulocyte ghosts.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 317, 286-293 (1981)
136. PORZIG, H., BECKER, C., REUTER, H.:
Competitive and non-competitive interactions between
specific ligands and beta-adrenoceptors in living
cardiac cells.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 321, 89-99 (1982)
137. POWELL, J.R., BRODY, M.J.:
Identification and specific blockade of two receptors
for histamine in the cardiovascular system.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 196, 1-14 (1976)
138. RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W., and BERTHET, J.:
The relationship of epinephrine and glucagon to liver
phosphorylase IV. Effect of epinephrine and glucagon
on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates.
J.Biol.Chem. 224, 463-475 (1957)

139. RICK, W.:
Klinische Chemie und Mikroskopie.
Springer Verlag, Berlin 29-31 und 101-103 (1977)
140. RODBELL, M.:
Regulation of glucagon action at its receptors.
In: Glucagon (eds.: Lefebvre, P.J., and Unger, R.H.)
Pergamon Press, Oxford (1972)
141. ROMERO, J.A., ZATZ, M., KEBABIAN, J.W., AXELROD, J.:
Circadian cycles in binding of ^3H -alprenolol to beta-
adrenergic receptor sites in rat pineal.
Nature 258, 435-436 (1975)
142. ROSS, E.M., HOWLETT, A.C., FERGUSON, K.M., and
GILMAN, A.G.:
Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase
activity with resolved components of the enzyme.
J.Biol.Chem. 253, 6401-6412 (1978)
143. ROTH, G.S.:
Hormone receptor changes during adulthood and
senescence: significance for aging research.
Fed.Proc. 38, 1910-1914 (1979)
144. RUGG, E.L., BARNETT, D.B., NAHORSKI, S.R.:
Coexistence of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in mamma-
lian lung: evidence from direct binding studies.
Mol.Pharmacol. 14, 996-1005 (1977)
145. SACHS, L.:
Angewandte Statistik: Planung und Auswertung, Methoden
und Modelle..
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1974)
146. SAGER, G., NORAAS, S., JACOBSEN, S., STENERUD, Ø.,
AAKESSON, I.:
The influence of filtrability on beta-adrenergic ligand
binding to membrane fragments from human erythrocytes
and mononuclear leukocytes.
Biochem.Pharmacol. 32, 12, 1943-1946 (1983)

147. SANO, Y., RUPRECHT, H., MANO, K., BEGLEY, M., BEWTRA, A.,
TOWNMLEY, R.:
Leukocyte beta-adrenergic receptor assay in normals
and asthmatics.
Clin.Res. 27, 403 A, abstract (1979)
148. SCARPACE, P.J., ABRASS, I.B.:
Thyroid hormone regulation of rat heart, lymphocyte,
and lung beta-adrenergic receptors.
Endocrinology 108, 3, 1007-1011 (1981)
149. SCARPACE, P.J., LITTNER, M.R., TASHKIN, D.P.
ABRASS, I.B.:
Lymphocyte beta-adrenergic refractoriness induced by
theophylline or metaproterenol in healthy and asthmatic
subjects.
Life Sci. 31, 1567-1573 (1982)
150. SCATCHARD, G.:
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann.New York Acad.Sci. 51, 660-672 (1949)
151. SCHOCKEN, D.D., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J.:
The human placenta - a rich source of beta-adrenergic
receptors: characterization of the receptors in
particulate and solubilized preparations.
J.Clin.Endocrin.Metab. 50, 1082-1088 (1980)
152. SCHOCKEN, D.D., ROTH, G.S.:
Reduced beta-adrenergic receptor concentrations in aging
man.
Nature 267, 856-858 (1977)
153. SHEPPARD, J.R., GORMUS, R., MOLDOW, C.F.:
Catecholamine hormone receptors are reduced on chronic
lymphocytic leukaemic lymphocytes.
Nature 269, 693-695 (1977)

154. SNYDER, S.H., PERT, C.B., and PASTERNAK, G.V.:
In: Handbook of Psychopharmacology (eds: Iversen, L.L.,
Iversen, S., and Snyder, S.H.)
Plenum Press, New York (1975)
155. SPIEGEL, A.M., BILEZIKIAN, J.P., AURBACH, G.D.:
Increased adrenergic receptor content in membranes of
stress-induced erythrocytes.
Clin.Res. 23, 390c (1975)
156. SPIEGEL, A.M., DOWNS, R.W., LEVINE, M.A., SINGER, M.J.,
KRAWIETZ, W., MARX, S.J., WOODARD, C.J., REEN, S.A.,
and AURBACH, G.D.:
The rôle of guanine nucleotides in regulation of
adenylate cyclase activity.
Recent Progress in Hormone Research 37, 635-665 (1981)
157. STADEL, J.M., and LEFKOWITZ, R.J.:
The beta-adrenergic receptor: ligand binding studies
illuminate the mechanisms of receptor-adenylate cyclase.
In: Current topics in membranes and transport. Vol.18
(eds.: Kleinzeller, A., Martin, B.R.)
Academic Press (1983)
158. STEER, M.L., ATLAS, D.:
Demonstration of human platelet beta-adrenergic receptors
using ^{125}J -labeled Cyanopindolol and ^{125}J -labeled
Hydroxybenzylpindolol.
BBA 686, 240-244 (1982)
159. SU, Y.-E., HARDEN, T.K., and PERKINS, J.P.:
Catecholamine-specific desensitization of adenylate
cyclase: Evidence for a multistep process.
J.Biol.Chem. 255, 7410-7419 (1980)
160. SZENTIVANYI, A.:
The beta-adrenergic theory of the atopic abnormality
in bronchial asthma.
J.Allergy 42, 203-232 (1968)

161. TASHKIN, D.P., CONOLLY, M.E., DEUTSCH, R.I.:
Subsensitization of beta-adrenoceptors in airways and
lymphocytes of healthy and asthmatic subjects.
Am.Rev.Respir.Dis. 125, 185-193 (1982)
162. TOHMEH, J.F., CRYER, P.E.:
Biphasic adrenergic modulation of beta-adrenergic
receptors in man: agonist-induced early increment and
late decrement in beta-adrenergic receptor number.
J.Clin.Invest. 65, 836-840 (1980)
163. TOMASI, V., KORETZ, S., RAY, T.K., DUMICK, J.,
MARINETTI, G.V.:
Hormone action at the membrane level II. The binding
of epinephrine and glucagon to rat liver plasma
membranes.
BBA 211, 31-42 (1970)
164. VERRIER, V., FAYET, G., LISSITZKY, S.:
Thyrotropin-binding properties of isolated thyroid
cells and their purified plasma membranes.
Eur.J.Biochem. 42, 355-365 (1974)
165. VESTAL, R.E., WOOD, A.J.J., SHAND, D.G.:
Reduced beta-adrenoceptor sensitivity in the elderly.
Clin.Pharmacol.Ther. 26, 181-186 (1979)
166. VORLÄNDER, :
Praxis der Immunologie
Georg Thieme Verlag , Stuttgart, 124 (1976)
167. WALSH, D.A., PERKINS, J.P., KREBS, E.G.:
An adenosine 3'-5'-monophosphate dependant protein-
kinase from rabbit skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 243, 3763-3774 (1968)
168. WEINSTEIGER, M.:
Nachweis und Quantifizierung beta-adrenerger Rezeptoren
an Herzmuskel- und Lungengewebe von Meerschweinchen.
Inauguraldissertation, München (1981)

169. WESSELS, M.R., MULLIKIN, D., and LEFKOWITZ, R.J.:
Differences in agonist and antagonist binding following
beta-adrenergic receptor desensitization.
J.Biol.Chem. 253, 3371-3373 (1978)
170. WILLIAMS, R.S., GUTHROW, C.E., and LEFKOWITZ, R.J.:
Beta-adrenergic receptors of human lymphocytes are
unaltered by hyperthyroidism.
J.Clin.Endocrin.Metab. 48, 503-505 (1979)
171. WILLIAMS, L.T., LEFKOWITZ, R.J., WATANABE, A.M.,
HATHAWAY, D.R., BESCH, H.R.jr.:
Thyroid hormone regulation of beta-adrenergic receptor
number.
J.Biol.Chem. 252, 2787-2789 (1977)
172. WILLIAMS, L.T., SNYDERMAN, R., LEFKOWITZ, R.J.:
Identification of beta-adrenergic receptors in human
lymphocytes by (-) ^3H -alprenolol binding.
J.of Clin.Invest. 57, 149-155 (1976)
173. WOLFE, B.B., HARDEN, T.K., MOLINOFF, P.B.:
Beta-adrenergic receptors in rat liver: effects of
adrenalectomy.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 1343-1347 (1976)
174. ZUCKER-FRANKLIN, D.:
The percentage of monocytes among mononuclear cell
fractions obtained from normal human blood.
J.of Immunology 112, 1, 234-240 (1973)

Zu besonderem Dank bin ich verpflichtet:

Herrn Priv.-Doz. Dr. E. ERDMANN, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe mitzuwirken,

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. KRAWIETZ, der mir bei der Durchführung der Versuche stets mit Rat zur Seite stand, mich gründlich in wissenschaftliches Denken und Arbeiten einführte, mir bei der Interpretation und Diskussion der Befunde stets bereitwillig zur Verfügung stand und der es verstand, bei mir Engagement für die experimentelle Kardiologie zu wecken,

Frau M. SCHÖBER, die mir bei der Durchführung des umfangreichen Versuchsprogramms unermüdlich und immer freundlich geholfen hat und

Frau E. UNTERBERG für alle geduldige Hilfe beim Anfertigen der Abbildungen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen bedanken, die die vorliegende Arbeit kritisch durchgelesen haben.

LEBENS LAUF

Am 1. Januar 1959 wurde ich als drittes Kind des Pfarrers Wilhelm Unterberg und seiner Ehefrau, der Apothekerin Ingeborg, geb. Fuchs in Schwelm/Westfalen geboren.

Von 1965-1968 besuchte ich in Schwelm die Volksschule. Daran schloß sich von 1968-1977 der Besuch des neu-sprachlichen Zweiges des Märkischen Gymnasiums Schwelm an. Meine Reifeprüfung legte ich dort am 27.5.1977 ab.

Nach einem dreimonatigen Krankenpflegepraktikum am Marien-hospital in Schwelm begann ich im Oktober 1977 mein Medizin-studium an der Universität Düsseldorf. Dort bestand ich die Ärztliche Vorprüfung im August 1979 und den Ersten Teil der Ärztlichen Prüfung im Sommer 1980.

Im Oktober 1980 wechselte ich im dritten klinischen Semester an die Julius-Maximilians-Universität Würzburg und im April 1981 an die Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich am 18.3.1983 den Zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung ab-legte.

Während des Praktischen Jahres arbeitete ich an der Neuro-logischen Klinik (Dir.: Prof. Dr. A. Schrader), der Medizini-schen Klinik I (Dir.: Prof. Dr. G. Riecker) und der Chirur-gischen Klinik (Dir.: Prof. Dr. G. Heberer), alle im Klini-kum Großhadern der Universität München.

Mein Studium schloß ich am 4.5.1984 mit dem Dritten Teil der Ärztlichen Prüfung ab; die Approbation als Ärztin wurde mir am 9.5.1984 erteilt.

Seit August 1984 bin ich als wissenschaftliche Angestellte des Sonderforschungsbereiches 89 (Kardiologie) am Zentrum für Innere Medizin der Universität Göttingen (Abteilung Kardiologie, Dir.: Prof. Dr. H. Kreuzer) tätig.

